

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Bc. Karolína Strnadová

Indukce diferenciací testikulárních kmenových buněk
Xenopus tropicalis in vitro

Induction of *Xenopus tropicalis* testicular stem cell differentiation *in vitro*

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Tereza Tlapáková, Ph.D.

Praha, 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 15. 8. 2016

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí mé diplomové práce **RNDr. Tereze Tlapákové, Ph.D.** za odborné vedení, trpělivost, ochotu a čas, který mi v průběhu zpracování diplomové práce věnovala. Poděkování patří i doc. RNDr. Ing. Vladimíru Krylovovi, Ph.D. za odborné rady a pomoc. Dále děkuji Mgr. Markétě Vegrichtové, Mgr. Andree Mančíkové, Mgr. Xuan Nguyen, Ing. Martinu Knytlovi, Ph.D., Mgr. Aleši Petelákovi, Janě Dvořákové, Tereze Kratochvílové, Bc. Kristýně Kroumanové, Bc. Monice Bláhové a Bc. Ondřeji Smolíkovi za příjemné pracovní prostředí a pomoc. V neposlední řadě děkuji své rodině, příteli a přátelům za podporu během celého studia.

Abstrakt

Původ somatických buněk vyvíjejících se varlat zůstává u savců prozatím nejasný. Kultura testikulárních buněk založená z varlat juvenilního samce *Xenopus tropicalis* by mohla přispět k jeho objasnění. Expresní profil ukázal transkripci některých genů pluripotence, dále somatických Sertoliho a peritubulárních myoidních buněk a v neposlední řadě i mezenchymálních kmenových buněk. Naopak exprese genů zárodečných buněk nebyla detekována. Imunocytochemická analýza těchto buněk pak odhalila expresi Vimentinu, Sox9 a α -aktinu hladké svaloviny, což naznačuje, že se jedná o společné progenitory Sertoliho a peritubulárních myoidních buněk a že tato buněčná kultura nevznikla spontánní reprogramací spermatogoniálních kmenových buněk. Testování buněčné kultury *X. tropicalis* během indukce diferenciací *in vitro* odhalilo, že se pravděpodobně jedná o multipotentní buňky se schopností diferencovat do adipocytů, chondroblastů a osteoblastů. Získání nové populace multipotentních kmenových buněk otevírá nové možnosti v biotechnologiích a medicíně.

Klíčová slova: Testikulární somatické buňky, *Xenopus tropicalis*, progenitor, mezenchymální kmenové buňky, indukce diferenciací, multipotence

Abstract

Origin of mammalian somatic cells in the developing testes remains unclear. This origin could be explained by established cell culture derived from testes of *Xenopus tropicalis* juvenile male. The expression profile of the cell culture showed transcription of some pluripotency genes, somatic Sertoli and peritubular myoid cell markers and last but not least, the mesenchymal stem cell markers. Conversely, germ cell genes were downregulated. Immunocytochemical analysis revealed expression of Vimentin, Sox9 and α -smooth muscle actin, indicating that the testicular cell culture is a common mesenchymal progenitor of the Sertoli and peritubular myoid cells and that the cell culture did not arise from spermatogonial stem cells undergoing incomplete reprogramming *in vitro*. Testing of *X. tropicalis* cell culture during induction of differentiation *in vitro* revealed that these cells are probably multipotent with the ability to differentiate into adipocytes, chondroblasts and osteoblasts. The ability to derive multipotent stem cells from the juvenile testes opens new possibilities of using these cells for biotechnology and medicine.

Keywords: Testicular somatic cells, *Xenopus tropicalis*, progenitor, mesenchymal stem cells, induction of differentiation, multipotency

Obsah

1	Seznam zkratek.....	1
2	Úvod	4
3	Literární přehled	5
3.1	<i>Xenopus tropicalis</i>	5
3.2	Testikulární buňky	6
3.2.1	Původ a identifikace somatických testikulárních buněk	6
3.2.2	Původ a identifikace zárodečných buněk	8
3.3	Kmenové buňky	9
3.3.1	Charakteristika kmenových buněk	9
3.3.2	Mezenchymální kmenové buňky	11
3.3.3	Kmenové buňky odvozené z varlat	12
3.4	Řízená diferenciaci <i>in vitro</i>	17
3.4.1	Ektoderm	17
3.4.2	Mezoderm.....	19
3.4.2.1	<i>Osteogeneze</i>	19
3.4.2.2	<i>Chondrogeneze</i>	20
3.4.2.3	<i>Adipogeneze</i>	21
3.4.2.4	<i>Diferenciace v kardiomyocyty</i>	22
3.4.3	Endoderm.....	22
4	Cíle práce	24
5	Materiál	24
5.1	Živý materiál.....	24
5.1.1	Zvřata a chovy	24
5.1.2	Založení buněčné kultury	24
5.2	Kultivační média	25
5.3	Média pro indukovanou diferenciaci.....	25
5.3.1	Diferenciační médium doplněné o kyselinu askorbovou	25
5.3.2	Diferenciační médium doplněné o kyselinu retinovou	25
5.3.3	Diferenciační médium doplněné o kyselinu askorbovou, dexamethazon a β -glycerofosfát.....	26
5.3.4	StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit	26
5.3.5	StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit	26

5.3.6	StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit	27
5.4	Izolace RNA a analýza DNA.....	27
5.4.1	Izolace RNA a čištění DNázou	27
5.4.2	Příprava cDNA.....	27
5.4.3	RT-PCR	27
5.5	Histologické barvení	27
5.6	Imunocytochemické barvení	28
5.7	Ostatní chemikálie a materiál	29
6	Metody	29
6.1	Kultivace a disociace.....	29
6.2	Příprava jednobuněčné suspenze	30
6.3	Růstová křivka	30
6.4	FACS	30
6.5	Izolace RNA, čištění DNázou, příprava cDNA	31
6.6	RT-PCR	32
6.7	Diferenciace	33
6.7.1	Metoda Hanging drop (metoda zavěšené kapky).....	33
6.7.2	Úprava povrchu sklíček želatinou.....	34
6.7.3	Úprava povrchu sklíček poly-lysinem.....	34
6.7.4	Spontánní diferenciace	34
6.7.4.1	<i>Pokus č. 1</i>	34
6.7.4.2	<i>Pokus č. 2</i>	34
6.8	Indukovaná diferenciace.....	35
6.8.1	Diferenciace v kardiomyocyty.....	35
6.8.1.1	<i>Pokus č. 1</i>	35
6.8.1.2	<i>Pokus č. 2</i>	35
6.8.1.3	<i>Pokus č. 3</i>	36
6.8.2	Diferenciace v adipocyty.....	36
6.8.2.1	<i>Pokus č. 1</i>	36
6.8.2.2	<i>Pokus č. 2</i>	36
6.8.2.3	<i>Pokus č. 3</i>	37
6.8.3	Diferenciace v chondroblasty	37
6.8.3.1	<i>Pokus č. 1</i>	37
6.8.3.2	<i>Pokus č. 2</i>	37

6.8.4	Diferenciace v osteoblasty.....	38
6.8.4.1	<i>Pokus č. 1.....</i>	38
6.8.4.2	<i>Pokus č. 2.....</i>	38
6.8.4.3	<i>Pokus č. 3.....</i>	38
6.8.5	Diferenciace v neuroektoderm.....	39
6.8.5.1	<i>Pokus č. 1.....</i>	39
6.9	Histologické barvení	39
6.9.1	Barvení olejovou červení O	39
6.9.2	Barvení alciánovou modří	39
6.9.3	Barvení alizarinovou červení S	40
6.10	Imunocyto­logické barvení.....	40
7	Výsledky	41
7.1	Charakteristika XtTSC	41
7.2	Růstová křivka	43
7.3	Standardizace metody Hanging drop	44
7.4	Spontánní diferenciace	46
7.5	Indukovaná diferenciace.....	47
7.5.1	Diferenciace v kardiomyocyty.....	47
7.5.2	Diferenciace v adipocyty.....	49
7.5.3	Diferenciace v chondroblasty	54
7.5.4	Diferenciace v osteoblasty.....	57
7.5.5	Diferenciace v neuroektoderm.....	62
8	Diskuze	64
9	Závěr	71
10	Seznam literatury.....	72
	Přílohy.....	83
	Příloha A.....	84
	Příloha B.....	87

1 Seznam zkratek

3β-HSD	3 β -hydroxysteroid dehydrogenase	3 β -hydroxysteroid dehydrogenáza
α2Col6	α chain 2 of type 6 collagen	α řetězec 2 kolagenu typu VI
AA	Ascorbic acid	Kyselina askorbová
α –SMA (Sma)	α -smooth muscle actin	α aktin hladké svaloviny
BSA	Bovine serum albumine	Hovězí sérový albumin
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid	Komplementární deoxyribonukleová kyselina
C/EBPα (<i>cebpa</i>)	CCAAT/enhancer-binding protein α	CCAAT/zesilující vazebný protein α
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-diamidin-2-fenylindol
DMAA		Diferenciační médium doplněné o kyselinu askorbovou
DMADG		Diferenciační médium doplněné o kyselinu askorbovou, dexamethazon a β -glycerofosfát
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	
DMRA		Diferenciační médium doplněné o kyselinu retinovou
dpc	Day post coitum	Den po oplození
EBs	Embryoid bodies	Embryoidní tělíska
ECM	Extracellular matrix	Extracelulární matrix
EGs	Embryonic germ cells	Embryonální zárodečné buňky
EGF	Epidermal growth factor	Epidermální růstový faktor
ESCs	Embryonic stem cells	Embryonální kmenové buňky
FABP4	Fatty acid-binding protein- 4	Vazebný protein mastných kyselin- 4
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting	Separace buněk na základě fluorescenčního signálu

FBS	Fetal bovine serum	Fetální bovinní sérum
FGF2	Fibroblast growth factor 2	Fibroblastový růstový faktor 2
Fld-ESCs	FGF2 low-dose-dependent ESCs	ESCs závislé na nízké dávce FGF2
GDNF	Glial cell line-derived neurotrophic factor	Neurotrofický faktor odvozený z gliové buněčné linie
gPSCs	Germline-derived pluripotent stem cells	Pluripotentní kmenové buňky odvozené ze zárodečné linie
GSCs	Germline stem cells	Kmenové buňky zárodečné linie
HGF	Hepatocyte growth factor	Hepatocytární růstový faktor
htES-like buňky	Human testis-derived ES-like cells	Lidské buňky podobné ESCs odvozené z varlat
IGF	Insulin-like growth factor	Růstový faktor podobný insulinu
LIF	Leukemia inhibitory factor	Leukemický inhibiční faktor
LCs	Leydig cells	Leydigovy buňky
LPL	Lipoprotein lipase	Lipoprotein lipáza
MACS	Magnetic-activated cell sorting	Magneticky aktivované třídění buněk
maGSCs	Multipotent adult germline stem cells	Multipotentní adultní kmenové buňky zárodečné linie
MEFs	Mouse embryonic fibroblasts	Myší embryonální fibroblasty
METRO	Message transport organiser	
mGSCs	Multipotent germline stem cells	Multipotentní kmenové buňky zárodečné linie
mhtSCs	Multipotent human testis-derived stem cells	Multipotentní lidské kmenové buňky odvozené z varlete
mLIF	mouse Leukemia inhibitory factor	myší Leukemický inhibiční faktor
NAA	Neurofilament associated antigen	Antigen asociovaný s neurofilamenty
NSE	Neuron-specific enolase	Neuron-specifická enoláza
PBS	Phosphate buffered saline	Fosfátový pufr
PGCs	Primordial germ cells	Primordiální zárodečné buňky

PPARγ (<i>pparg</i>)	Peroxisome proliferator activated receptor γ	Receptor γ aktivovaný proliferátorem peroxisomů
PTMCs	Peritubular myoid cells	Peritubulární myoidní buňky
RA	Retinoic acid	Kyselina retinová
RNA	Ribonucleic acid	Ribonukleová kyselina
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction	Reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce
SCs	Sertoli cells	Sertoliho buňky
SCF	Stem cell factor	Faktor kmenových buněk
SCO syndrome	Sertoli cell only syndrome	„pouze Sertoliho buňky“ syndrom
SGCM	Sertoli-germ cell mass	Masa Sertoliho a zárodečných buněk
Sry	Sex-determining region Y	Pohlaví determinující region Y
SSCs	Spermatogonial stem cells	Spermatogoniální kmenové buňky
TGF-α	Transforming growth factor α	Transformující růstový faktor α
TGF-β	Transforming growth factor β	Transformující růstový faktor β
TRITC	Tetramethyl-rhodamine isothiocyanate	Tetramethylrhodamin isothiokyanát
XtTSC	<i>Xenopus tropicalis</i> Testicular Somatic Cells	Testikulární somatické buňky <i>Xenopus tropicalis</i>
XtTSCc	<i>Xenopus tropicalis</i> Testicular Somatic Cells colonies	Kolonie testikulárních somatických buněk <i>Xenopus tropicalis</i>
XtTSC-RFP	<i>Xenopus tropicalis</i> Testicular Somatic Cells-RFP	RFP pozitivní testikulární somatické buňky <i>Xenopus tropicalis</i>
XtTSCc-RFP	<i>Xenopus tropicalis</i> Testicular Somatic Cells colonies-RFP	RFP pozitivní kolonie testikulárních somatických buněk <i>Xenopus tropicalis</i>

2 Úvod

V současné době je problematika kmenových buněk předmětem intenzivního zkoumání. Jedná se o zdroj buněk s možným využitím v oblasti regenerační medicíny a orgánové transplantace, a to díky svým schopnostem sebeobnovy a diferenciaci. Právě z hlediska diferenciačního potenciálu jsou nejzajímavější pluripotentní kmenové buňky, které dokáží diferencovat do buněk ektodermu, mezodermu a endodermu. Tuto skupinu nyní tvoří dobře prostudované embryonální kmenové buňky (ESCs – embryonic stem cells) (Martin 1981; M. J. Evans and Kaufman 1981; Thomson et al. 1998). Jedním z cílů současného výzkumu je však nalézt takovou pluripotentní populaci kmenových buněk, u níž by nevznikal etický problém, jaký představuje u lidí izolace ESCs z vnitřní buněčné masy embryí. Jednou z možností, jak takové buňky získat, je jejich izolace z testikulární tkáně.

Semenotvorné kanálky varlat představují zdroj hned několika typů buněk. Peritubulární myoidní buňky (PTMCs – peritubular myoid cells) a Sertoliho buňky (SCs – Sertoli cells) tvoří bazální membránu semenotvorných kanálků (Skinner et al. 1985), přičemž SCs jsou rovněž nezbytné pro maturaci zárodečných buněk (Berndtson and Thompson 1990). Populace Leydigových buněk pak tvoří stabilní buněčnou linii produkující pohlavní hormon testosteron.

Většina dosud zveřejněných výzkumů popisuje testikulární kmenové buňky jako linie vzniklé spontánní dediferenciací spermatogoniálních kmenových buněk *in vitro* a v některých případech dokonce tyto buňky vykazují pluripotentní stav (Conrad et al. 2008; Ko et al. 2009; Golestaneh et al. 2009). Na druhou stranu byly popsány i kultury testikulárních kmenových buněk pravděpodobně somatického původu vykazující některé z charakteristik mezenchymálních kmenových buněk (MSCs – mesenchymal stem cells), jako je např. exprese typických genů pro MSCs a *in vitro* diferenciaci do adipocytů, chondrocytů a osteocytů (Gonzalez et al. 2009; Chikhovskaya et al. 2012; Chikhovskaya et al. 2014).

V Laboratoři vývojové biologie PřF UK se podařilo založit stabilní buněčnou kulturu z varlat juvenilního samce *Xenopus tropicalis*, která se skládá z adherentní podpůrné vrstvy podobné Sertoliho buňkám a z kolonií buněk podobným ESCs. Na základě dosažených výsledků je tato testikulární buněčná kultura *X. tropicalis* považována za

progenitory somatických buněk varlat s vlastnostmi MSCs. Cílem této diplomové práce bylo zjistit, jaký mají tyto buňky diferenciační potenciál.

3 Literární přehled

3.1 *Xenopus tropicalis*

Již delší dobu patří žáby rodu *Xenopus* mezi jedny z nejvýznamnějších modelových organismů vývojové biologie. Obecně se *Xenopus* řadí mezi drápkaté žáby, které pocházejí z mokřadu a bažin střední a jižní Afriky. Systematicky spadají do čeledi Pipidae, kde je rozlišováno hned několik rodů. Drápkaté žáby jsou pak dle ploidie jednotlivých druhů přiřazovány ke dvěma rodům a to *Xenopus* a *Silurana* (B. J. Evans et al. 2004). Do první zmíněné větve se řadí tetraploidní drápatka vodní, *Xenopus laevis*, která se stala klíčovou pro studium mechanismů na buněčné a molekulární úrovni. Výhodou samic jsou jejich velké oocyty, které lze v laboratorních podmínkách získat hormonálním řízením jejich cyklu a u nichž je možné po vnějším oplození snadno pozorovat časnou embryogenezi a organogenezi. Do robustních embryí lze následně injikovat nukleové kyseliny či proteiny a odolávají i mikrochirurgickým zákrokům a transplantacím (Kashiwagi et al. 2010).

Do popředí zájmu se na přelomu tisíciletí dostala drápatka tropická (*Xenopus tropicalis*) z rodu *Silurana* (B. J. Evans et al. 2004), která má oproti *X. laevis* hned několik výhod. *X. tropicalis* představuje diploidní druh s 10 páry chromozomů, jehož genom je celkově menší ($1,7 \times 10^9$ bp oproti $3,1 \times 10^9$ bp u *X. laevis*) a byl zcela sekvenován (Hellsten et al. 2010), což jej předurčuje k využití pro multigenerační genetické a genomické studie. Další výhodou je rychlejší životní cyklus jak samce, tak samice, která klade až 9x více oocytů než samice *X. laevis*. V neposlední řadě je přínosem i menší velikost dospělých jedinců, které se dají v laboratorních podmínkách chovat ve větším počtu (Kashiwagi et al. 2010).

Vzhledem k podobnosti *X. laevis* a *X. tropicalis* je možné používat standardní protokoly či protilátky, vyvinuté u jednoho druhu, u obou druhů (Khokha et al. 2002).

3.2 Testikulární buňky

Počáteční formování varlete v embryonálním vývoji je souhrou činnosti několika buněčných typů a to zárodečných buněk, Sertoliho buněk, endoteliálních a intersticiálních buněk.

3.2.1 Původ a identifikace somatických testikulárních buněk

U savců zastává v časných fázích pohlavního vývoje hlavní roli gen *Sry* (sex-determining region Y) na chromozomu Y, jehož exprese předurčuje vznik varlat z intermediárního mezodermu (Gubbay et al. 1990). Působením genu *Sry* dochází ke zvýšené regulaci exprese genu *Sox9* (Sekido et al. 2004), což u myši působí na buňky coelomového epitelu, které začnou migrovat do XY gonád během 11,2 – 11,4 dne *post coitum* (dpc – den po oplození) a diferencovat v Sertoliho buňky (SCs). V pozdějším stádiu pak buňky coelomového epitelu částečně diferencují na buňky intersticia (Karl and Capel 1998). Tvzení, že SCs diferencují z migrujících buněk coelomového epitelu, však bylo vyvráceno a bylo potvrzeno, že do embryonálního základu varlete mezi 11,5 a 12,5 dpc migrují zárodečné buňky a přítomné SCs je obklopují, čímž tvoří masu Sertoliho a zárodečných buněk (SGCM – Sertoli-germ cell mass) (Nel-Themaat et al. 2011).

SCs jsou hlavními regulátory spermatogeneze, zachovávají diferencovaný fenotyp peritubulárních myoidních buněk (PTMCs – peritubular myoid cells) a také udržují populaci progenitorů Leydigových buněk (LCs – Leydig cells) v postnatálním varleti (Rebourcet et al. 2014). Mezi geny specifické pro nematurované SCs patří např. cytokeratin 18 či GATA4 (Bar-Shira Maymon et al. 2005; Yagi et al. 2007). Geny specifické pro maturované Sertoliho buňky jsou potom intermediární filamentum vimentin (Steger et al. 1996) a také již výše zmíněný *Sox9* (Kent et al. 1996). U *X. tropicalis* byla exprese *Sox9* poprvé pozorována v jádře somatických buněk podporující buňky zárodečné a to až po metamorfóze samce. Na základě morfologické a imunohistologické analýzy bylo potvrzeno, že se jedná o buňky podobné SCs, tudíž se dá předpokládat, že exprese *Sox9* je v rámci evoluce obratlovců konzervovaná (El Jamil et al. 2008). Jednou z důležitých vlastností SCs je tvorba bariéry mezi krví a varletem a zároveň modulace imunitní odpovědi tak, aby nedocházelo k autoimunitní reakci na nově vznikající zárodečné buňky (Kaur et al. 2015).

Embryonální základ varlete je definován jak budoucím semenotvorným kanálkem, tak samotným intersticiem, na kterém se kromě výše zmíněného coelomového epitelu podílí i mesonephros. Mesonephros, který vzniká z intermediárního mezodermu, tvoří základ při vývoji Wolffova vývodu a leží paralelně k vyvíjejícím se gonádám. U myších embryí bylo zjištěno, že buňky z oblasti mesonephros migrují v čase 11,5 dpc a vytváří populace peritubulárních myoidních buněk a endoteliálních buněk (Buehr et al. 1993; Merchant-Larios et al. 1993). Ukázalo se však, že touto migrující populací jsou pouze endoteliální buňky, které zajišťují vaskularizaci varlete a jeho správný vývoj (Combes et al. 2009). Naopak PTMCs jsou pravděpodobně mezenchymálního původu a diferencují v blízkosti embryonálních základů varlete, které následně obklopují (Jeanes et al. 2005). Fakt, že jsou PTMCs nemigrující populací buněk, byl potvrzen i jednou z publikovaných studií. Pro účely tohoto výzkumu byla připravena transgenní myší linie exprimující v mesonephros a většině intersticiálních buněk (ne však endoteliálních) žlutý fluorescenční protein pod kontrolou promotoru α -aktinu hladkého svalstva (α -Sma - α -smooth muscle actin), tedy genu typického pro PTMCs. Pozorováním těchto buněk v rámci embrya bylo zjištěno, že v čase mezi 11,5 – 12,5 dpc tyto buňky z mesonephros nemigrují a ani se tedy nepodílí na tvorbě embryonálního základu varlete (Cool et al. 2008).

PTMCs jsou kontraktilní buňky s mnoha aktinovými vlákny a jsou hlavním zdrojem leukemického inhibičního faktoru (LIF – leukemia inhibitory factor), jehož receptory byly prokázány u dočasně kmenových Leydigových buněk. LIF je cytokin, který obecně podporuje sebeobnovu některých typů kmenových buněk a přežívání primordiálních zárodečných buněk *in vitro* (Maekawa et al. 1996; Piquet-Pellorce et al. 2000; Ge et al. 2006). Mezi geny typické pro rané PTMCs se řadí kolagen typu I, inhibin betaA, caldesmon 1 a tropomyosin 1 (Jeanes et al. 2005).

Původ Leydigových buněk je dosud nejasný. Chen et al. 2009 ve své práci shrnují, že LCs diferencují z kmenových buněk, které jsou podobné mezenchymálním a jsou součástí intersticia, a že v průběhu postnatálního vývoje prochází čtyřmi stádii: kmenové, progenitorové, nezralé a adultní. Detailní analýza intersticia ve vyvíjející se myší gonádě odhalila, že na vzniku steroidogenních LCs se podílí buňky coelomového epitelu a perivaskulární buňky, které se nachází na hranici mezi gonádou a mesonephros a vykazují možný multipotentní charakter. Jak bylo zmíněno výše, cévy jsou nedílnou součástí

správného vývoje varlete a právě perivaskulární buňky na periferii cév navádí ostatní intersticiální buňky do prostředí varlete (DeFalco et al. 2011). LCs jsou známé produkcí pohlavního hormonu testosteronu, který ovlivňuje zrání spermií a vývoj sekundárních pohlavních znaků jedince. Během vývoje LCs dochází k expresi těchto genů: receptor pro luteinizační hormon (LH-receptor), transformující růstový faktor alfa (TGF- α - transforming growth factor alpha) a 3 β -hydroxysteroid dehydrogenáza (3 β -HSD - 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase) (Teerds et al. 1999).

3.2.2 Původ a identifikace zárodečných buněk

Prekurzory zárodečných buněk jsou označovány jako primordiální zárodečné buňky (PGCs – primordial germ cells) a jsou nezbytné pro přenos genetické informace do dalších generací. U obratlovců jsou známy dva způsoby determinace PGCs. Buď vznikají na základě specifických zárodečných determinant v okrsku mateřské cytoplazmy neboli zárodečné plazmy, nebo vznikají pod vlivem indukčních signálů od okolních buněk. První způsob je znám i u obojživelníků. U *Xenopus* se zárodečná plazma nachází na vegetálním pólu oocyty a je součástí oblasti METRO (message transport organiser) mitochondriálního mraku. Mitochondriální mrak obsahuje jak mitochondrie, tak elektron-denzní granulofibrilární materiál, který je považován za prekursor germinálních granulí. Zárodečná plazma kromě germinálních granulí obsahuje mitochondriální, kódující i nekódující RNA zahrnující některé geny jako *xcat2*, *xdazl*, *DEADSouth*, *xpat*, *xwnt11* či *xlirts* (Heasman et al. 1984; Kloc et al. 2002).

U *Xenopus* byla popsána izolace PGCs z embryí, které byly následně značeny TRITC (tetramethyl-rhodamine isothiocyanate) a transplantovány do neznačených hostitelských embryí ve stádiu pozdní blastuly. Výsledky ukázaly, že injikované PGCs diferencovaly do buněk všech tří zárodečných listů a zachovaly si tak pluripotentní charakter. To naznačuje, že vývoj PGCs u drápkatých žab je podobný myšimu modelu, u kterého se PGCs vyvíjí bez zárodečné plazmy z již pluripotentních proximálních buněk epiblastu (Wylie et al. 1985).

Právě u myši byly provedeny *in vitro* studie, které potvrdily, že se PGCs mohou stát pluripotentními buňkami, a to v případě jejich kultivace s LIF, fibroblastovým růstovým faktorem 2 (FGF2 – fibroblast growth factor 2; též bFGF) a faktorem kmenových buněk (SCF – stem cell factor; též ligand *c-kit*). Tato stimulovaná proliferace

PGCs vedla k tvorbě kolonií, které se morfologicky podobaly koloniím embryonálních kmenových buněk (ESCs – embryonic stem cells). Tyto konvertované buňky byly pojmenovány jako embryonální zárodečné buňky (EGs – embryonic germ cells) (Matsui et al. 1992; Resnick et al. 1992).

3.3 Kmenové buňky

3.3.1 Charakteristika kmenových buněk

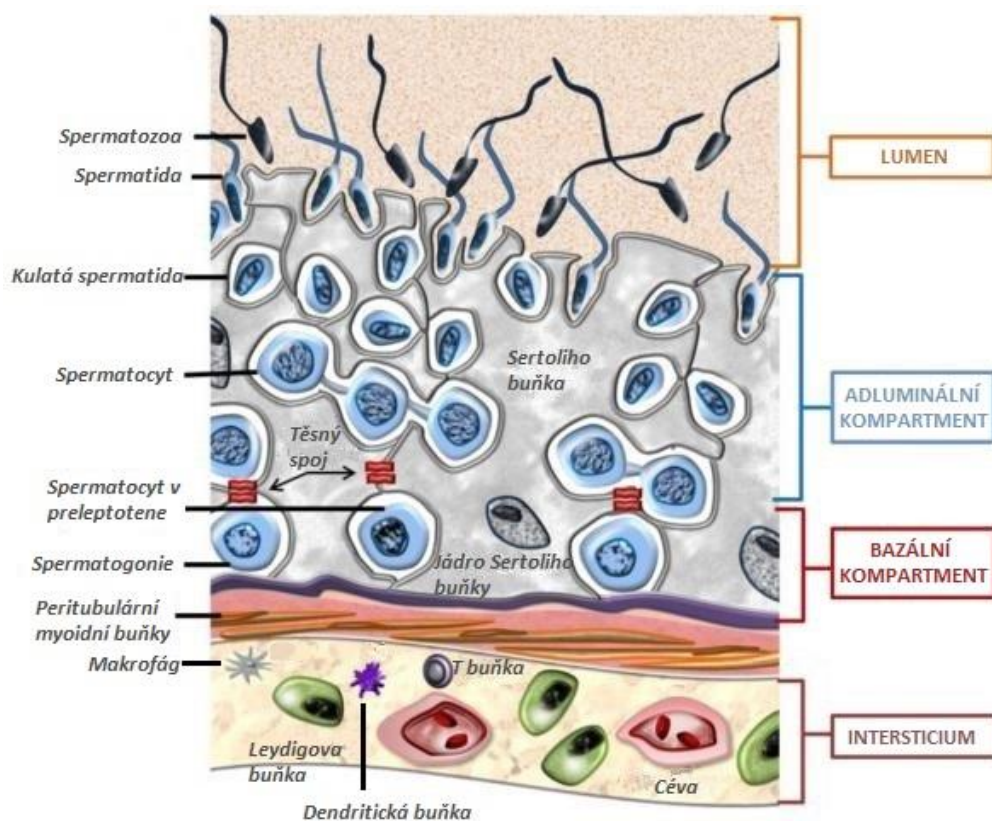
V rámci regenerativní medicíny je očekáván velký přínos od kmenových buněk a to vzhledem k jejich vlastnostem sebeobnovy a diferenciaci do různých buněčných typů.

Na základě diferenciacního potenciálu jsou kmenové buňky děleny na totipotentní, pluripotentní, multipotentní a unipotentní. Totipotentní charakter má zygota a blastomery časného embrya, které jsou schopny vytvořit jak vlastní tělo zárodku, tak extraembryonální struktury (amnion, chorion, alantois, zárodečný stvol). Pluripotentní kmenové buňky jsou již omezeny na diferenciaci v buňky všech tří zárodečných listů, tzn. ektoderm, mezoderm a entoderm. Mezi pluripotentní kmenové buňky se řadí ESCs z vnitřní buněčné masy blastocysty, které se podařilo poprvé izolovat roku 1981 z blastocysty myši a kultivovat v nediferencovaném stavu za následujících podmínek. ESCs vyžadují růst na podkladové vrstvě např. embryonálních fibroblastů a kultivační médium musí obsahovat LIF a fetální bovinní sérum (FBS – fetal bovine serum) (M. J. Evans and Kaufman 1981; Martin 1981).

Kmenové buňky s multipotentním charakterem diferencují do buněk konkrétní buněčné linie a jedná se např. o hematopoetické kmenové buňky, mezenchymální kmenové buňky (viz kapitola 3.3.2) nebo rychle se dělící gastrointestinální kmenové buňky. Unipotentní kmenové buňky se pak vyvíjí pouze v jeden buněčný typ a jsou označovány jako tzv. progenitorové buňky. Příkladem je spermie vyvinutá ze spermatogoniální kmenové buňky (SSCs – spermatogonial stem cells).

Pro udržení dostatečně velké populace kmenových buněk je nezbytná jejich sebeobnova, která probíhá pomocí asymetrického dělení, kdy vzniká jak buňka nediferencovaná, tak buňka progenitorová diferencující posléze v konkrétní buněčný typ. Mikroprostředí, které udržuje počet naivních kmenových buněk, se nazývá nika (niche).

Z výzkumu zveřejněného v r. 2007 a provedeného na myších varlatech vyplývá, že nediferencované SSCs se nacházejí v blízkosti vaskulární sítě, sousedících Leydigových a i dalších intersticiálních buněk. Po zahájení jejich diferenciace tyto niky opouští a zaujímají místo v bazálním kompartmentu semenotvorného kanálku (Obr. 1). V případě nárůstu testikulární tkáně dochází k opětovnému obnovení cévního zásobení a pravděpodobně i k novému ustanovení těchto mikroprostředí (Yoshida et al. 2007).



Obr. 1 Semenotvorný kanálek. Intersticiu varlete je tvořeno Leydigovými buňkami, cévami, dendritickými buňkami, T buňkami a makrofágy a od samotného semenotvorného kanálku je odděleno bazální membránou s peritubulárními myoidními buňkami. Těsné spoje mezi Sertoliho buňkami tvoří hemato-testikulární bariéru a dělí kanálek na bazální a adluminální kompartment. Směrem dovnitř kanálku probíhá zrání zárodečných buněk v ději zvaném spermatogeneze (převzato a upraveno podle Kaur et al. 2015).

Na bazální membráně semenotvorného kanálku, tedy na modifikované extracelulární matrix (ECM – extracellular matrix), se vyskytují SCs, které hrají v ní klíčovou roli. Je u nich spuštěna exprese neurotrofického faktoru odvozeného z gliové buněčné linie (GDNF – glial cell line- derived neurotrophic factor) a FGF2, které jsou považovány za důležité růstové faktory s výrazným vlivem na

sebeobnovu nejen SSCs, ale také dalších tkáňově-specifických kmenových buněk u savců (shrnutí v Oatley & Brinster 2012).

3.3.2 Mezenchymální kmenové buňky

Mezenchymální kmenové buňky (MSCs) jsou multipotentní kmenové buňky vřetenovitého tvaru s podobnou morfologií, jakou známe u fibroblastů (Hematti 2012). Nejprve byly MSCs izolované z kostní dřeně popsány jako kolonie formující fibroblasty (CFU-F – colony-forming unit-fibroblastic cells) (Friedenstein et al. 1976). Název „mezenchymální kmenové buňky“ zavedl roku 1991 A. I. Caplan, který je ve své práci popsal jako skupinu buněk tvořící kost a chrupavku (A. Caplan 1991). S narůstajícím zájmem o MSCs, kdy izolace z různých tkání vykazovaly nepatrně odlišné vlastnosti, ustanovil výbor Mezinárodní společnosti pro buněčnou terapii několik kritérií pro identifikaci MSCs. Zaprvé musí buňky za standardních kultivačních podmínek adherovat k plastu, dále musí u těchto buněk docházet k expresi specifických povrchových molekul CD105, CD73 a CD90 a naopak nesmí exprimovat CD45, CD34, CD14 nebo CD11b, CD79 α nebo CD19 a MHC třídy II a na závěr musí buňky v *in vitro* podmínkách diferencovat do adipocytů, chondroblastů a osteoblastů.

Geny, k jejichž expresi by u MSCs nemělo docházet, jsou většinou geny specifické pro hematopoetické progenitory a endoteliální buňky (CD34) nebo buňky imunitního systému (např. CD19). Pro potvrzení, že u testovaných buněk proběhla v *in vitro* podmínkách diferenciace, se používají běžně dostupné histologické barvicí techniky. Pro osteoblasty se používá alizarinová červeň nebo barvení podle von Kossy¹, pro adipocyty olejová červeň O barvicí lipidové váčky a pro diferencované chondroblasty se zejména využívá barvení proteoglykanů chrupavky pomocí alcianové modři nebo imunohistologické barvení kolagenu typu II (Dominici et al. 2006).

Jak již bylo zmíněno výše, původně byly MSCs identifikovány a izolovány z kostní dřeně. Později se nicméně ukázalo, že mohou být snadno izolovány i z tukové tkáně, z plic, z Whartonovy želatiny okolo cév pupeční šňůry, z pupečnickové krve, ze synoviální tekutiny, z amniotické tekutiny, z krve plodu, ze zubní dřeně i z kosterní svaloviny (shrnutí v Kobolak et al. 2015).

¹ Histologická metoda k průkazu vápenatých solí založená na redukci dusičnanu stříbrného na stříbro.

Mezenchymální původ byl prokázán i u buněk izolovaných z biopsií varlat pacientů s rakovinou prostaty nebo syndromem označovaným jako „pouze Sertoliho buňky“ (SCO syndrome – Sertoli cell only syndrome), který se vyznačuje absencí zárodečných buněk ve varlatech. Právě kultury odvozené od vzorků pacientů se syndromem SCO ukázaly rapidní přichycení ke kultivačnímu podkladu a proliferaci somatických buněk vedoucí k tvorbě kolonií. Tyto buňky byly nazvány jako multipotentní lidské kmenové buňky odvozené z varlete (mhtSCs - multipotent human testis-derived stem cells). V případě, že byly izolovány spolu se somatickými buňkami i SSCs, byla v rámci pokusů použita metoda MACS (magnetic-activated cell sorting – magneticky aktivované třídění buněk) pro získání čisté populace SSCs na základě pozitivitu CD49f ($\alpha 6$ -integrin) na povrchu buněk. Záhy se ale ukázalo, že CD49f je typický nejen pro myši a lidské SSCs, ale také pro somatické buňky varlat včetně MSCs. Z tohoto důvodu byla používána také selekce pomocí matrix, která odstranila CD49f pozitivní somatické buňky. V průběhu kultivací se poté ukázalo, že samotné SSCs v kultuře neproliferují a netvoří kolonie mhtSCs, a to ani v případě použití kondiciovaného média z testikulárních buněk. Z toho vyplývá, že faktory produkované somatickými buňkami do média neovlivňují proliferaci SSCs, ale spíše je žádoucí přímý kontakt se somatickými buňkami (Conrad et al. 2008; Chikhovskaya et al. 2012; Chikhovskaya et al. 2014).

Větší pozornost si zaslouží i schopnost MSCs interagovat s imunitním systémem a modulovat jeho odpověď. Jejich imunomodulační účinek spočívá v sekreci solubilních faktorů, jako jsou prostaglandin E2 (PGE2), TGF- β , indolamin 2,3-dioxygenáza, interleukin 10 a hepatocytární růstový faktor (HGF – hepatocyte growth factor) (Susumu Ikehara 2013).

3.3.3 Kmenové buňky odvozené z varlat

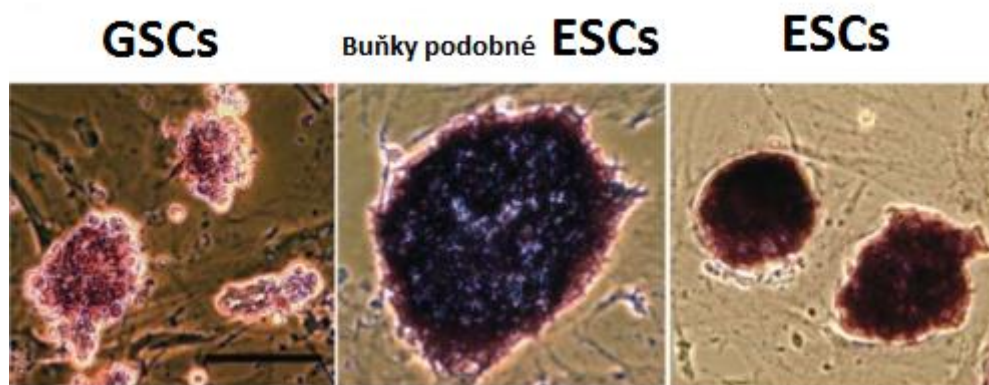
Spermatogoniální kmenové buňky jsou považovány za unipotentní kmenové buňky, které dávají vzniknout spermii v průběhu procesu spermatogeneze. V rámci několika studií byla popsána izolace SSCs jak z myši, tak člověka a jejich dlouhodobá kultivace, která vedla ke změně diferenciačního potenciálu.

Jedna z prvních studií popisovala izolaci SSCs z varlat neonatální myši. Při kultivaci bylo použito médium s GDNF, LIF, FGF2 (bFGF) a epidermální růstový faktor

(EGF – epidermal growth factor). Zmíněná kombinace růstových faktorů podpořila proliferaci těchto buněk, které byly nazvány jako kmenové buňky zárodečné linie (GSCs – germline stem cells). Ve srovnání s ESCs či EGCs, které se vyskytují pouze v embryonálním období, mohou být GSCs odebrány i z postnatálního varlete. Dalším rozdílem je, že ESCs po transplantaci do semenotvorného kanálku působí tvorbu nádorů složených z mnoha buněčných typů neboli tzv. teratomy (Stevens 1984) a příjemci těchto pluripotentních buněk umírají. Naopak transplantované GSCs produkovaly v hostiteli normální spermie a nebyl prokázán jejich podíl na tvorbě teratomů ani na diferenciaci v jiné somatické buňky. Proliferační aktivita GSCs probíhala déle než 5 měsíců a pod vlivem růstových faktorů formovaly kolonie (Kanatsu-Shinohara et al. 2003). Později bylo zjištěno, že GSCs lze kultivovat *in vitro* buď bez podpůrné vrstvy myších embryonálních fibroblastů (MEFs – mouse embryonic fibroblasts) nebo bez použití séra, a že nejdůležitějším růstovým faktorem je GDNF, bez něhož se GSCs nedělily. Při použití lamininu jako podpůrné vrstvy namísto MEFs, se změnila morfologie GSCs a i když tvořily shluky jako v případě MEFs, častěji se objevovaly i buňky podobné fibroblastům. Růst GSCs na lamininu byl pomalejší než na MEFs a nebylo ho možné použít při kultivaci GSCs bez séra (Kanatsu-Shinohara et al. 2005).

Zajímavostí bylo, že v kultuře GSCs byly náhodně nalezeny i morfologicky odlišné kolonie, které se velmi podobaly koloniím ESCs či kultivovaným buňkám epiblastu (Kanatsu and Nishikawa 1996; Kanatsu-Shinohara et al. 2004). Obecně tyto kolonie vznikaly zhruba 4-7 týdnů od zahájení kultivace a měly kompaktnější strukturu. Během dalších 2–3 týdnů se kolonie podobné ESCs staly v kultuře dominantními a přerostly ostatní GSCs. Problémem však bylo, že pasážováním těchto kolonií a používáním média pro GSCs, ztrácely buňky podobnost s ESCs. Z tohoto důvodu byly změněny kultivační podmínky a bylo použito standardní kultivační médium pro ESCs, tedy s LIF a 15% FBS, které umožnilo jejich dlouhodobý růst a tvorbu kolonií podobných ESCs. Tyto buňky byly posléze podrobeny fenotypické analýze pomocí průtokové cytometrie, která odhalila silnou pozitivní reakci pro SSEA-1 (gen typický pro ESCs), EE2 (gen typický pro spermatogoniální buňky), β 1- a α 6-integrin (gen typický pro GSCs), CD9 (gen typický pro ESCs a GSCs) a EpCAM (gen typický pro spermatogonií a ESCs). Buňky podobné ESCs dále prokázaly slabou pozitivní reakci u Forssmanova antigenu (gen typický pro ESCs) a c-kit (typické pro diferencované spermatogonie). Naopak u GSCs byly SSEA-1

a Forssmanův antigen negativní, což potvrzuje odlišný fenotypový původ u buněk podobných ESCs. Navíc kolonie podobné ESCs ukázaly pozitivní reakci na přítomnost alkalické fosfatázy podobně jako embryonální kmenové buňky (Obr. 2).



Obr. 2 Průkaz alkalické fosfatázy. Barvení alkalickou fosfatázou prokázalo silnou reakci jak u embryonálních kmenových buněk (ESCs), tak u buněk podobných ESCs (převzato a upraveno podle Kanatsu-Shinohara et al. 2004).

Na základě těchto zjištění byla provedena indukce diferenciaci buněk podobných ESCs *in vitro*. Tyto buňky diferencovaly jak v hematopoetické, vaskulární a spontánně bijící myocyty, tak byla prokázána i diferenciaci směrem k neurální linii. Vzhledem k výsledkům byly buňky podobné ESCs pojmenovány jako multipotentní kmenové buňky zárodečné linie (mGSCs – multipotent germline stem cells) (Kanatsu-Shinohara et al. 2004). V další studii tým Kanatsu-Shinohara et al. (2008) naznačil, že se pravděpodobně jedná o dediferenciaci SSCs směrem k pluripotentnímu stavu. To podporuje i fakt, že GSCs i mGSCs exprimují několik transkripčních faktorů (Pou5f1, Sox2, Myc a Klf4) nutných k reprogramování fibroblastů do stavu pluripotence.

O několik let později se podařilo izolovat SSCs i z varlat dospělé myši a to na základě specifického genu spermatogonií *Strat-8*. Tyto buňky byly pojmenovány jako multipotentní adultní kmenové buňky zárodečné linie (maGSCs – multipotent adult germline stem cells) a vykazovaly podobné vlastnosti jako GSCs, např. obnovu spermatogeneze po jejich transplantaci do semenotvorných kanálků myší, které postrádají zárodečné buňky anebo tvorbu kolonií podobných ESCs pod vlivem LIF v kultivačním médiu. Kultivace maGSCs byla vyzkoušena za čtyř rozdílných podmínek. Za podmínky I se vytvořilo nejvíce kolonií podobných kultivovaným buňkám epiblastu, nicméně

přidáním LIF do média (podmínka II) nebo kultivací maGSCs na mitomycinem-C ovlivněných MEFs (podmínka III) se formovaly kolonie podobné ESCs. Pokud byly přítomny MEFs a LIF v médiu zároveň (podmínka IV), došlo k nárůstu těchto kolonií. Na základě podobnosti s embryonálními kmenovými buňkami byla použita i metoda „Hanging drop“, která je běžně používanou metodou pro indukci diferenciaci ESCs v *in vitro* podmínkách (Guan et al. 1999; Guan et al. 2006).

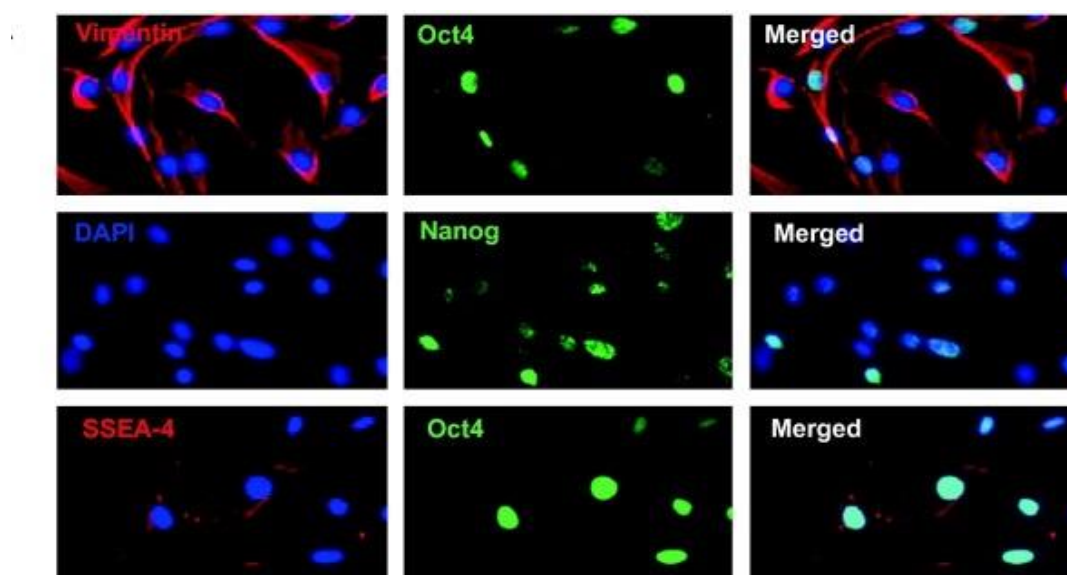
Metoda zavěšené kapky (Hanging drop) spočívá v kultivaci ESCs a jiných potencionálně pluripotentních buněk v médiu bez LIF a na neadhezivním povrchu, která vede k tvorbě trojrozměrných shluků neboli tzv. embryoidních tělísek (EBs – embryoid bodies). EBs tak napodobují embrya v časném vývoji savců, kdy dochází k diferenciaci ESCs do buněk tří zárodečných listů. Tato metoda je tak velmi cenným nástrojem pro výzkum embryonálního vývoje *in vitro*, protože je obtížné a časově náročné izolovat buňky z právě se vyvíjejících embryí (Höpfl et al. 2004).

Metoda „Hanging drop“ podpořila spontánní diferenciaci *in vitro* i u maGSCs, která byla potvrzena reverzně transkripční polymerázovou řetězovou reakcí (RT-PCR - reverse transcription polymerase chain reaction) a imunocytologickým barvením struktur typických pro buňky ektodermu (např. neuroepiteliální marker nestin), mezodermu (např. srdeční transkripční faktory *Gata4* a *Nkx2.5*) a endodermu (např. marker časně diferenciaci v hepatocyty α -fetoprotein). K potvrzení diferenciaci *in vivo* byly maGSCs injikovány do podkoží imunodeficientních myší, kde jako u mGSCs vytvořily teratomy (Guan et al. 2006).

Ve výše zmíněných studiích však nebyly prokázány všechny charakteristiky pluripotence, proto se izolované buňky označují jako multipotentní. To změnila až studie z roku 2009, ve které buňky izolované z varlat dospělé myši ukázaly jak diferenciaci *in vivo* a *in vitro*, tvorbu teratomů po transplantaci do varlat, tak tvorbu chimér po transplantaci do blastocyst. Tyto buňky byly označeny jako pluripotentní kmenové buňky odvozené ze zárodečné linie (gPSCs - germline-derived pluripotent stem cells). Zajímavostí bylo, že tato konverze do pluripotentního stavu závisela na jednoduché kultivační podmínce, a to vyšetí méně jak 8000 gPSCs na jamku v 24-jamkové destičce, čímž pravděpodobně došlo k ustanovení vhodného mikroprostředí pro reprogramaci buněk (Ko et al. 2009).

Úspěšně byly izolovány i buňky odvozené od SSCs z varlat dospělých mužů, které vykazovaly podobné vlastnosti jako ESCs. Izolace těchto multipotentních/pluripotentních buněk při biopsiích tkáně varlat pacientů je možností, jak by se eventuálně dalo předejít imunologickým problémům při autotransplantacích (Conrad et al. 2008; Kossack et al. 2009; Golestaneh et al. 2009).

Vhodnou alternativou by mohla být i populace buněk nazvaná kmenové buňky gonád (gonadal stem cells), které se také podařilo izolovat z lidské testikulární tkáně. Rozdílem je, že se expresí specifických genů podobají spíše MSCs. Na základě výsledků imunocytologické analýzy u nich byla zjištěna exprese i intermediárního filamentu mezenchymálních buněk vimentinu a pluripotentních genů Oct4, Nanog a v malé míře i SSEA-4 (Obr. 3). To, že kmenové buňky gonád nejsou odvozené ze zárodečné linie, potvrdila metoda RT-PCR pro geny Vasa a Dazl, které byly negativní.



Obr. 3 Exprese genů specifických pro pluripotentní stav u kmenových buněk gonád. Imunocytologická analýza odhalila expresi genů Oct4, Nanog a v malé míře SSEA-4 v populaci kmenových buněk gonád. Tyto buňky mají aktivní i intermediární filamentum vimentin (převzato a upraveno podle Gonzalez et al. 2009).

Vše nasvědčuje tomu, že se opravdu jedná o buňky mezenchymálního původu, což bylo navíc potvrzeno změnou kmenových buněk gonád v adipocyty, chondroblasty a osteoblasty pod vlivem diferenciačních médií v rámci indukce diferenciace *in vitro* (Gonzalez et al. 2009).

3.4 Řízená diferenciace *in vitro*

Diferenciace je proces vedoucí ke strukturní a funkční specializaci buněk v dané tkáni. Základem je aktivita specifických transkripčních faktorů a exprese genů typických pro daný buněčný typ, ve který se progenitorová buňka diferencuje. Následuje strukturní změna cytoskeletu a reorganizace organel, buňka roste, moduluje svůj metabolismus a může produkovat komponenty ECM.

Pro indukci diferenciace se v podmínkách *in vitro* používají růstové faktory a další komponenty, kterými se obohacují předem definovaná kultivační média, ale i běžně dostupné komerční sady chemikálií, jejichž hlavní nevýhodou je složení chráněné patentem. V následujících kapitolách budou popsány složky diferenciačních médií, které umožnily diferenciaci kmenových buněk v buňky ektodermu, mezodermu a endodermu.

3.4.1 Ektoderm

Ektoderm je zárodečný list, který v časném embryu determinuje vznik epidermis, neuroektodermu (nervová soustava a neurální lišta) či žláz s vnější sekrecí (mléčné, potní, slinné, slzné).

Nejvíce používaným faktorem pro indukci diferenciace je kyselina retinová (RA – retinoic acid), jejíž účinek potlačuje diferenciaci do buněk mezodermu a naopak ji stimuluje směrem k (neuro)ektodermu. Růstový faktor FGF2 je dalším faktorem podporujícím u myši vznik neuronů, zatímco u primátů včetně člověka udržuje nediferencovaný stav ESCs. V rámci jedné studie byla proto u makaka jávského založena buněčná linie vycházející z ESCs, která nevyžadovala pro zachování nediferencovaného stavu přítomnost FGF2 v médiu. Tyto buňky byly pojmenovány jako ESCs závislé na nízké dávce FGF2 (Fld-ESCs – FGF2 low-dose-dependent ESCs), jelikož nelze zcela vyloučit, že nebyly ovlivňovány nepatrným množstvím FGF2 ze séra nebo podpůrné vrstvy buněk. Tato buněčná linie pomohla analyzovat vliv RA a FGF2 na neurální diferenciaci. V případě, že byla koncentrace RA v médiu pouze 1 μM , došlo k diferenciaci Fld-ESCs do neuronů. Ve spojení s FGF2 vznikaly kromě neuronů i astrocyty. Efekt FGF2 je tedy ovlivněn přítomností RA. Pokud není přítomna RA, FGF2 podporuje sebeobnovu a nediferencovaný stav ESCs (Hatori et al. 2014).

Jednou z prvních zmínek o neurální diferenciaci MSCs byla studie, ve které byl použit jednoduchý diferenciační protokol s využitím 2-merkaptetanolu. Izolované

MSCs z kostní dřeni potkana byly nejdříve po dobu 2 h ponechány v médiu se sérem a 1 mM 2-merkaptetanolem. Následně bylo v diferenciačním médiu vynecháno sérum a byla zvýšena koncentrace 2-merkaptetanolu (1 – 10 mM). Stačila pouze hodina kultivace a MSCs začaly měnit svou morfologii. Po více jak 3 h byla již viditelná změna v neurony. Důkazem pak byla i zvýšená exprese neuron-specifické enolázy (NSE – neuron-specific enolase). Tento postup byl zopakován i v případě lidských MSCs, u kterých se potvrdilo podobné chování jako u buněk z potkana. Navíc byly tyto buňky pozitivní i na neurofilamentum-M (Woodbury et al. 2000). Fakt, že diferenciaci vyvolává 2-merkaptetanol, byl podpořen o 6 let později dalším výzkumem (Mareschi et al. 2006).

U ESCs myši se podařilo vyvolat diferenciaci i v buňky podobné motorickým neuronům. Kromě výše zmíněné RA (1 μ M) byl do média přidán i sonic hedgehog (Shh) (300 nM) pro aktivaci diferenciace EBs v buňky podobné neuronům. Po osmidenní kultivaci byly EBs disociovány a vysety na želatinou potažené Petriho misky. Jejich kultivace pak probíhala v kultivačním médiu bez séra a s neurobazálním médiem v poměru 1:1, které bylo navíc doplněno o N2B27 komponentu (Javanmardy et al. 2016). N2 je směsí inzulinu, apotransferinu, progesteronu, putrescinu, seleničitanu sodného a hovězího sérového albuminu (BSA – bovine serum albumine) (Ying et al. 2003). B27 je suplementem složeným zhruba z 20 faktorů, příkladem jsou vitaminy A (retinol) a E, glutathion, superoxid dismutáza či kortikosteron (Y. Chen et al. 2009). Během 18denní kultivace byly k vznikajícím neuronům přidávány růstové faktory FGF2, EGF a GDNF za účelem zvýšení jejich přežití (Javanmardy et al. 2016).

Velký klinický význam má i vývoj metod za účelem opravy velké plochy poškozené kůže, např. v důsledku popálenin či kožních defektů. Jednou z takových metod by mohla být i řízená diferenciace MSCs v buňky podobné epidermis. V nedávné studii se podařilo izolovat lidské MSCs z pupeční šňůry a kultivovat je v kondiciovaném médiu pro epidermální buňky (klasické kultivační médium s přidáním EGF, FGF2, inzulinem, RA a chloridem vápenatým). Na základě toho došlo k diferenciaci v buňky podobné buňkám epidermis, což bylo potvrzeno i imunocytologickým barvením proti cytokeratinu 19, který je typický pro epidermální buňky. Značný vliv na diferenciaci mělo doplnění Wnt3a do kondiciovaného média pro epidermální buňky, čímž došlo až ke zdvojnásobení počtu diferencovaných buněk. Důvodem byla aktivace Wnt signální dráhy (Sun et al. 2015).

3.4.2 Mezoderm

Jak již bylo zmíněno v kapitole 3.3.2, MSCs mají schopnost diferencovat do adipocytů, chondroblastů a osteoblastů. Vzhledem k této schopnosti se MSCs jeví jako zajímavý zdroj progenitorových buněk, které mohou být využity v oblasti regenerativní medicíny a tkáňového inženýrství. Právě z těchto důvodů byly navrženy různé komponenty médií pro diferenciaci v *in vitro* podmínkách.

3.4.2.1 Osteogeneze

Kost je metabolicky aktivní orgán a během života jedince dochází k jeho remodelaci. Jedná se o cyklus, kdy osteoklasty natráví starou kost a osteoblasty tvoří kost novou, dokud nedojde k úplné výměně. V průběhu diferenciaci fibroblastických MSCs dochází ke změně jejich morfologie v kuboidní osteoblasty. Osteoblasty začnou produkovat ECM složenou hlavně z kolagenu typu I a později produkují kalciové agregáty barvitelné alizarinovou červení nebo metodou von Kossa (Hadjidakis and Androulakis 2006).

Standardním protokolem pro diferenciaci *in vitro* je kultivace konfluentní vrstvy MSCs pod vlivem dexametazonu, kyseliny askorbové (AA- ascorbic acid) a β -glycerofosfátu v médiu po dobu několika týdnů.

Dexametazon je syntetický glukokortikoid, který je považován za nezbytnou součást osteogeneze. Ačkoliv je jeho přesný mechanismus působení neznámý, nejpravděpodobnějším vysvětlením je, že ovlivňuje transkripci (Vater et al. 2011). V první řadě indukuje transkripci genu pro kostní sialoprotein (Ogata et al. 1995) a zadruhé stimuluje expresi integrinu $\alpha 5$ a transkripčního koaktivátoru s PDZ- vázajícím motivem s následnou aktivací Runx-2 závislé transkripce genů (Hong et al. 2009).

V roce 1985 bylo popsáno, že koncentrace dexametazonu nutná k indukci osteogeneze u buněk vazivového obalu okostice je 100 nM, což bylo využito i v dalších diferenciačních protokolech (Tenenbaum and Heersche 1985). Nicméně Walsh et al. (2001) provedli *in vitro* analýzu lidských MSCs z kostní dřeně a zjistili, že kritickou koncentrací dexametazonu je fyziologická hodnota glukokortikoidů, tedy 10 nM. Zároveň objasnili, že při vyšších koncentracích dexametazon nemá vliv na diferenciaci a maturaci MSCs v osteoblasty, ale pouze na proliferaci progenitorů, což může být klíčovým faktorem pro vznik osteoporózy (redukce kostní hmoty). Kromě toho mají

glukokortikoidy obecně inhibiční vliv na syntézu kolagenu. Nicméně v přítomnosti AA je vliv glukokortikoidů na kolagen utlumen (Vater et al. 2011).

Kyselina askorbová je důležitým kofaktorem hydroxylace prolinových a lysinových zbytků ve struktuře kolagenu. Její nevýhodou je nestálost v roztocích, a to hlavně za standardních kultivačních podmínek (37°C, 5% CO₂ a pH 7,5), proto je vhodnější nahradit ji derivátem vitamínu C askorbát-2-fosfátem (Hata and Senoo 1989; Takamizawa et al. 2004). I při koncentraci 10 mM AA nebyl nalezen žádný inhibiční účinek. Většinou se koncentrace pohybuje v rozmezí 50 až 500 µM (Takamizawa et al. 2004; Song et al. 2009; Pytlík et al. 2009).

Poslední složkou standardního diferenciačního média je β-glycerofosfát, jehož přítomnost je nezbytná pro mineralizaci ECM. Zároveň je substrátem alkalické fosfatázy, která jej hydrolyzuje a slouží jako zdroj anorganického fosfátu. Přítomnost β-glycerofosfátu v kultivačním médiu vede k mineralizaci, tvorbě laktátu, zvýšené aktivitě alkalické fosfatázy a také k syntéze proteinů a fosfolipidů naznačující osteogenní diferenciaci u MSCs. Obvykle se β-glycerofosfát přidává v koncentraci 5 – 10 mM (Chung et al. 1992; Vater et al. 2011).

Kromě výše zmíněných složek je možné médium obohatit o další komponenty jako vitamin D3 nebo růstový faktor TGF-β1 nebo použít komerční kity, které nabízí např. Thermo Fisher Scientific, Trevigen či R&D Systems (Vater et al. 2011).

3.4.2.2 Chondrogeneze

Chrupavka je další pojivovou tkání s mezodermálním původem. Je tvořena chondroblasty a chondrocyty a z velké části obsahuje ECM s dominantním kolagenem typu II a také agregáty proteoglykanů a glukosaminoglykanů, které jsou barvitelné alciánovou modří.

Jedním z prvních, kdo popsal indukci chondrogeneze *in vitro*, byl Johnstone et al. (1998). V této studii byly izolovány mezenchymální progenitorové buňky z kostní dřene králíka, které byly kultivovány ve zkumavkách jako trojrozměrné shluky pro zajištění těsného mezibuněčného kontaktu. Pod vlivem definovaného média bez FBS, které bylo doplněno o dexametazon a TGF-β1, byl pak spuštěn proces chondrogeneze.

Později se ukázalo, že dexametazon, TGF-β1 a askorbát se jeví jako nejúčinnější kombinace vedoucí ke vzniku chondrocytů. Dexametazon zajišťuje expresi specifických

genů pro chrupavku, např. kolagen typu II a IX či aggrecan, askorbát naopak podporuje proliferaci buněk (Na et al. 2007).

Vliv na diferenciaci MSCs byl popsán i u růstového faktoru podobného inzulinu (IGF – insulin-like growth factor), který moduluje průběh procesu chondrogenese tím, že stimuluje proliferaci, indukuje expresi genů specifických pro chondrocyty (kolagen typu II) a reguluje buněčnou apoptózu, která určuje budoucí tvar chrupavky (Longobardi et al. 2005).

Komerčně dostupné diferenciací média a doplňky vyrábí firmy Thermo Fisher Scientific, R&D Systems či Miltenyi Biotec.

3.4.2.3 Adipogeneze

Tuková tkáň je zásobárnou energie, zajišťuje mechanickou oporu orgánů a tepelnou izolaci organismu. Proces adipogeneze je souhrou působení několika transkripčních faktorů.

První z nich, receptor γ aktivovaný proliferátorem peroxisomů (PPAR γ – peroxisome proliferator activated receptor γ), je důležitý pro diferenciaci tukových buněk (Rosen et al. 1999). Bylo zjištěno, že u myši, které jsou deficientní v dalším faktoru CCAAT zesilujícím vazebném proteinu α (C/EBP α - CCAAT/enhancer-binding protein α), nedocházelo ke správnému vývoji tukové tkáně. Adipocyty těchto jedinců obsahovaly menší množství lipidů a nebyla spuštěna exprese a aktivace PPAR γ . Vzájemné propojení těchto dvou faktorů tedy hraje klíčovou roli v transkripční kontrole tukových buněk (Wu et al. 1999). Mezi další geny specifické pro adipocyty patří α řetězec 2 kolagenu typu VI (α 2Col6 - α chain 2 of type 6 collagen), lipoprotein lipáza (LPL – lipoprotein lipase), leptin, vazebný protein mastných kyselin- 4 (FABP4 - fatty acid-binding protein- 4) či adiponektin (Vater et al. 2011).

Standardní metoda indukce diferenciaci v preadipocyty nebo diferenciaci MSCs ve zralé adipocyty, je kultivace souvislé vrstvy buněk pod vlivem média s dexametazonem, 3-isobutyl-1-methyl- xanthinem, inzulinem a indomethacinem nebo jejich kombinací. Úspěšná diferenciaci je poté prokazována pomocí histologického barvení lipidových váček olejovou červení O (Oil red O) (M.-Y. Chen et al. 2009; Vater et al. 2011).

Diferenciace v adipocyty *in vitro* lze opět docílit komerčně dodávanými médii a doplňky, např. od firmy Thermo Fisher Scientific nebo Trevigenu. Druhá zmíněná firma ve svém protokolu uvádí, že doplněk obsahuje dexametazon, 3-isobutyl-1-metyl-xantin, indometacin, insulin a kompletní růstové médium pro MSCs.

3.4.2.4 Diferenciace v kardiomyocyty

Proces diferenciace kmenových buněk v srdeční svalovinu je obtížný a kardiomyocyty vznikající touto cestou vykazují spíše nezralé funkční a strukturní charakteristiky ve srovnání s dospělými kardiomyocyty. Nicméně existují i studie, ve kterých byl popsán vznik srdečních buněk během spontánní diferenciace (Rajala et al. 2011). Stačilo k tomu pouze vytvořit EBs z ESCs metodou „Hanging drop“, které byly následně kultivovány na miskách potažených želatinou. Po 21 dnech kultivace se objevily bijící klastry kardiomyocytů (Baharvand et al. 2005).

Standardním protokolem řízené diferenciace, která podporuje v naprosté většině případů diferenciaci EBs z ESCs v bijící kardiomyocyty, je doplnění AA do kultivačního média (Farokhpour et al. 2009). Přidání 10^{-4} M AA mělo vliv na diferenciaci i u zdánlivě pluripotentních kmenových buněk odvozených z myších varlat (Moraveji et al. 2012).

Mezodermální srdeční buňky se podařilo diferencovat i z EBs pluripotentních kmenových buněk odvozených z lidských varlat a to za použití 250 nM cardiogenolu-C po dobu 10 dní s navazující osmidenní kultivací v médiu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) s 20% FBS. Důkazem diferenciace v kardiomyocyty je pozitivní signál transkripčních faktorů GATA4, NKX2.5 či MEF2C (Golestaneh et al. 2009).

3.4.3 Endoderm

Intenzivně je zkoumána i řízená diferenciace do derivátů endodermu vzhledem ke svému nezpochybnitelnému významu v buněčných terapiích. Buňky endodermu dávají vzniknout epiteliální výstelce embryonálního střeva, z které posléze během organogeneze vzniká celý gastrointestinální trakt včetně přidružených orgánů (slinivka břišní a játra), dýchací trakt nebo např. některé slinné žlázy.

Langerhansovy ostrůvky jsou endokrinní částí pankreatu a obsahují několik typů buněk, z nichž asi nejznámější jsou beta buňky produkující hormon inzulin. Buňky podobné beta buňkám pankreatu se podařilo diferencovat z MSCs kostní dřeně potkana. Adherentní buňky směřované k diferenciaci byly nejdříve kultivovány pod vlivem 10

mmol/l nikotinamidu a 1 mmol/l 2-merkaptoetanolu v DMEM po dobu 24 h. Následujících 10 h bylo z média vynecháno sérum. U vznikajících buněk podobných beta buňkám byla potvrzena exprese inzulinu. Jako potenciální induktor diferenciace byl nejdříve zkoumán vliv vysokého obsahu glukózy, což ale nebylo potvrzeno. Až po přidání nikotinamidu, který chrání Langerhansovy ostrůvky před cytotoxicitou a napomáhá správné funkci beta buněk (Kolb and Burkart 1999), došlo k úspěšné transformaci MSCs na buňky podobné beta buňkám (L.-B. Chen et al. 2004).

Aktivin A je členem nadrodiny TGF- β a bylo dokázáno, že indukuje diferenciaci v definitivní endoderm i pankreatické buňky v závislosti na jeho koncentraci, kultivačních podmínkách a době působení. Obecně lze říci, že při aplikaci aktivinu A na lidské ESCs rostoucí v jedné vrstvě buněk (monolayer) došlo k úspěšné diferenciaci ve více případech (Kroon et al. 2008; K. A. D'Amour et al. 2006; K. a D'Amour et al. 2005; McLean et al. 2007) než ve srovnání s kulturou EBs (Shim et al. 2007). Navíc je pro diferenciaci myších ESCs v monolayeru potřeba nižší koncentrace aktivinu A (10 ng/ml) (Yasunaga et al. 2005) než v případě jejich kultivace v EBs (50 – 100 ng/ml) (Kubo et al. 2004).

V roce 2005 byl mimo jiné popsán tříkrokový protokol řízené diferenciace ESCs v pankreatické beta buňky. V tomto dvoutýdenním protokolu byla použita kombinace aktivinu A s RA, bFGF (FGF2) a N2B27. V prvním kroku byla nejdříve vytvořena EBs. V průběhu kultivace bylo použito 100 ng/ml aktivinu A a 10^{-6} M RA. Ve druhém kroku byl do média přidán bFGF o koncentraci 10 ng/ml pro zvýšení počtu prekurzorů buněk produkujících inzulin. Na závěr bylo použito médium DMEM/F12 s N2 a B27 suplementem, 1 μ g/ml lamininem, 10 ng/ml bFGF a 10 mM nikotinamidem. Tato kombinace faktorů umožnila zrání buněk produkujících inzulin. Analýza těchto buněk prokázala na základě exprese specifických genů, např. *insulin1*, *pdx1*, *glut2* či *isl1*, diferenciaci ESCs v beta buňky pankreatu (Shi et al. 2005).

Kombinace aktivinu A a RA vedla také k úspěšné diferenciaci buněk z oblasti presumptivního ektodermu *Xenopus laevis* do pankreatických buněk produkujících inzulin (Moriya et al. 2000).

4 Cíle práce

- Standardizace postupu metody zavěšené kapky („Hanging drop“) pro testikulární buňky kultury *Xenopus tropicalis*.
- Indukce diferenciace kolonií testikulárních somatických buněk *Xenopus tropicalis* (XtTSCc - *Xenopus tropicalis* Testicular Somatic Cells in colonies) a RFP pozitivních kolonií testikulárních somatických buněk *Xenopus tropicalis* (XtTSCc-RFP - *Xenopus tropicalis* Testicular Somatic Cells colonies-RFP) kombinací metody „Hanging drop“ a různých diferenciačních faktorů při kultivaci.
- Detekce genů typických pro buňky ektodermu, mezodermu, popř. endodermu u diferencovaných XtTSCc a XtTSCc-RFP na základě imunofluorescenčního a histologického barvení.
- Potvrzení diferenciačního statutu XtTSCc a XtTSCc-RFP pomocí RT-PCR analýzy genů specifických pro buňky ektodermu, mezodermu, popř. endodermu.

5 Materiál

5.1 Živý materiál

5.1.1 Zvířata a chovy

V experimentech byly použity dva kmeny *Xenopus tropicalis* pocházející z chovů PřF UK. Jednalo se konkrétně o kmen Nosek, který byl dlouhodobě chován v chovech Laboratoře vývojové biologie a kmen Nigerian Strain, který byl dodán firmou European Xenopus Resource Centre (Portsmouth).

5.1.2 Založení buněčné kultury

V Laboratoři vývojové biologie byla založena kultura testikulárních somatických buněk (XtTSC) z varlat juvenilního samce *X. tropicalis* z kmene Ivory Coast 6 měsíců po metamorfóze. Při dlouhodobé kultivaci XtTSC v kultivačním médiu s přídavkem rekombinantního myšího LIF (dále jen mLIF) docházelo k narůstání těchto buněk ve formě kolonií (XtTSCc).

5.2 Kultivační média

Buňky drápkatých žab mají jiný izotonický osmotický tlak (100 mM) než je tomu u savců (150 mM). Z tohoto důvodu je nutné veškerá média a roztoky s obsahem soli ředit na 2/3 (např. roztok PBS). Pro kultivaci testikulárních somatických buněk se v laboratoři standardně používá komplexní médium skládající se z 33,3 % L-15 Leibovitz média a 33,3 % RPMI 1640 HEPES modifikačního média, která jsou doplněna o 10% FBS (Life Technologies), 1,33 mg/ml NaHCO₃, 2 mM L-glutamin, 50 µl/ml gentamicin, 1mM pyruvát sodný a 0,1 mM 2-merkaptóetanol (vše ostatní Sigma-Aldrich). Pro zvýšení proliferační aktivity buněk a urychlení formování kolonií bylo do média přidáváno 1000 U/ml mLIF (ESGRO; Milipore). V textu budou dále uváděny termíny „médium bez mLIF“, popř. „médium s mLIF“.

V případě indukce diferenciaci bylo v některých pokusech použito Dulbecco's Modified Eagle médium (DMEM) a to ve složení: 33,3% DMEM (Gibco) doplněné o 10% FBS, 1,33 mg/ml NaHCO₃, 2 mM L-glutamin, 50 µl/ml gentamicinu a 0,1 mM 2-merkaptóetanol, popř. 1000 U/ml mLIF. Dále bude v textu používán termín „DMEM bez mLIF“, popř. „DMEM s mLIF“.

5.3 Média pro indukovanou diferenciaci

5.3.1 Diferenciační médium doplněné o kyselinu askorbovou

Diferenciační médium doplněné o kyselinu askorbovou (DMAA) se skládalo z 33,3% L-15 Leibovitz a 33,3% RPMI 1640 HEPES modifikačního média doplněných o 10% FBS, 1,33 mg/ml NaHCO₃, 2 mM L-glutamin, 50 µl/ml gentamicin, 1mM pyruvát sodný a 0,1 mM 2-merkaptóetanol a L-kyselinu askorbovou (kat. č. A4403; Sigma-Aldrich). V rámci experimentů byly použity různé koncentrace L-kyseliny askorbové a to 10⁻⁵ (0,176 µl/ml média), 10⁻⁴ (1,76 µl/ml média), 10⁻³ (17,6 µl/ml média) nebo 10⁻² (176 µl/ml média). Médium doplněné o DMAA je běžně používaným médiem pro indukci diferenciaci v kardiomyocyty (Takahashi et al. 2003).

5.3.2 Diferenciační médium doplněné o kyselinu retinovou

Diferenciační médium doplněné o kyselinu retinovou (DMRA) obsahovalo 33,3% L-15 Leibovitz a 33,3% RPMI 1640 HEPES modifikační médium doplněné o 10% FBS,

1,33 mg/ml NaHCO₃, 2 mM L-glutamin, 50 µl/ml gentamicin, 1mM purývát sodný, 0,1 mM 2-merkaptóetanol a 1 µM all trans-kyselínu retínovou (kat. č. R2625; Sigma-Aldrich). Kyselina retínová je možným supleméntem pro indukci diferenciacie bunék směrem k neurální linii (Moraveji et al. 2012).

5.3.3 Diferenciační médium doplněné o kyselinu askorbovou, dexamethazon a β-glycerofosfát

Diferenciační médium s kyselinou askorbovou, dexametazonem a β-glycerofosfátem (DMADG) se skládalo z 33,3% L-15 Leibovitz a 33,3% RPMI 1640 HEPES modifikačního média doplněných o 10% FBS, 1,33 mg/ml NaHCO₃, 2 mM L-glutamin, 50 µl/ml gentamicin, 1mM purývát sodný, 0,1 mM 2-merkaptóetanol, 0,05 mM askorbát-2-fosfát (kat. č. 49752), 100 nM dexametazon (kat. č. D4902) a 10 mM β-glycerofosfát (kat. č. G9422) (vše Sigma-Aldrich).

5.3.4 StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit

StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit byl vytvořen pro adipogenní diferenciaci MSCs *in vitro*. Tato sada se skládá ze 100 ml StemPro® adipogenního diferenciačního bazálního média (A10410-01) a 10 ml StemPro® adipogenního doplňku (A10065-01). Přesné složení je patentováno firmou Life Technologies. V našem případě bylo připraveno 2/3 diferenciační médium složené z 60 ml StemPro® adipogenního diferenciačního bazálního média, 10 ml StemPro® adipogenního suplementu, 50 µl gentamicinu (Sigma-Aldrich) a popř. 5 µl mLIF (Milipore). To bylo doplněno do 100 ml deionizovanou vodou.

5.3.5 StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit

StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit byl vytvořen pro chondrogenní diferenciaci MSCs *in vitro* a obsahuje 100 ml StemPro® chondrogenního/osteogenního diferenciačního bazálního média (A10069-01) a 10 ml StemPro® chondrogenního doplňku (A10064-01). Přesné složení je patentováno firmou Life Technologies. V našem případě bylo připraveno 2/3 diferenciační médium složené z 60 ml StemPro® chondrogenního/osteogenního diferenciačního bazálního média, 10 ml StemPro® chondrogenního suplementu, 50 µl gentamicinu (Sigma-Aldrich) a popř. 5 µl mLIF (Milipore). To bylo doplněno do 100 ml deionizovanou vodou.

5.3.6 StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit

StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit byl vytvořen pro osteogenní diferenciaci MSCs *in vitro* a obsahuje 100 ml StemPro® chondrogenního/osteogenního diferenciačního bazálního média (A10069-01) a 10 ml StemPro® osteogenního doplňku (A10066-01). Přesné složení je patentováno firmou Life Technologies. V našem případě bylo připraveno 2/3 diferenciační médium složené z 60 ml StemPro® chondrogenního/osteogenního diferenciačního bazálního média, 10 ml StemPro® osteogenního suplementu, 50 µl gentamicinu (Sigma-Aldrich) a popř. 5 µl mLIF (Milipore). To bylo doplněno do 100 ml deionizovanou vodou.

5.4 Izolace RNA a analýza DNA

5.4.1 Izolace RNA a čištění DNázou

- RNeasy® Mini Kit (74104; Qiagen)
- RNeasy® Micro Kit (74004; Qiagen)
- RNase-Free DNase Set (79254; Qiagen)

5.4.2 Příprava cDNA

- RevertAid H Minus FirstStrand cDNA Synthesis Kit (K1632; Thermo Scientific)

5.4.3 RT-PCR

- 10x Taq pufr s KCl (Thermo Scientific)
- 25 mM MgCl₂ (Thermo Scientific)
- 10 mM dNTP Mix (Thermo Scientific)
- Taq DNA polymeráza 5 U/µl (EP0402, Thermo Fisher Scientific)
- Tabulka se všemi použitými primery je uvedena v příloze A.

5.5 Histologické barvení

- Olejová červen O (O0625; Sigma-Aldrich)
- Alcianová modř (74240; Carl Roth)
- Alizarinová červen S (A5533; Sigma-Aldrich)

5.6 Imunocytoologické barvení

- 38% formaldehyd 30251 (Lach-Ner)
- 15 mM NH₄Cl
- 0,5% Triton X -100 v 2/3 PBS
- 2% BSA v 2/3 PBS (Sigma-Aldrich)
- 0,5% BSA v 2/3 PBS (Sigma-Aldrich)
- DAPI DES1000L (Intimex)
- Mowiol/DAPI
- Primární protilátky
 - 1E12 (anti-actinin; Developmental Studies Hybridoma Bank) – 1:4
 - 14h7 (anti-vimentin; Developmental Studies Hybridoma Bank) – 1:40
 - MT4 (anti-fibronektin; Developmental Studies Hybridoma Bank) – 1:25
 - CT3 (anti-troponin T; Developmental Studies Hybridoma Bank) – 1:15
 - CH1 (anti-tropomyosin; Developmental Studies Hybridoma Bank) – 1:20
 - CIIC1 (anti-kolagen typu II; Developmental Studies Hybridoma Bank) – 1:20
 - D7F2 (anti-MyoD; Developmental Studies Hybridoma Bank) - 1:20
 - NAA (antigen asociovaný s neurofilamenty; Developmental Studies Hybridoma Bank) – 1:50
 - anti-Sma (Sigma-Aldrich) – 1:400
 - anti-Sox9 (Sigma-Aldrich) – 1:300
 - TBX20 (marker srdečních progenitorů; Aviva Systems Biology) – 1:300
 - Zn12 (povrchový marker neurálních buněk; Developmental Studies Hybridoma Bank) – 1:500
- Sekundární protilátky
 - Alexa 488 anti-mouse (Thermo Fisher Scientific) – 1:500
 - Alexa 555 anti-mouse (Thermo Fisher Scientific) – 1:500
 - Alexa 488 anti-rabbit (Thermo Fisher Scientific) – 1:500

5.7 Ostatní chemikálie a materiál

- PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1 mM KH_2PO_4 a 0,65 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, pH 7,4
- 2/3 PBS: 2 díly PBS + 1 díl H_2O
- roztok papainu (61,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ v PBS) (L2223, Biochrom AG)
- trypsin-EDTA solution 10x (T4174, Sigma Aldrich)
- roztok trypsinu: 0,5 ml Trypsin-EDTA solution 10x + 4,5 ml 2/3 PBS
- 2% želatina (G1393, Sigma-Aldrich)
- sterilní filtrační nástavec - 30 mm, velikost pórů 0,22 μm (R666871, P-LAB)
- sítko pro filtraci buněk CellTrics® 20 μm (Partec)
- agaróza 50004 (Lonza)
- BFM (bromfenolová modř): 50% glycerol; 0,13 M EDTA-NaOH; 0,12% BFM (Sigma-Aldrich)
- Gene Ruler DNA Ladder mix (SM0333, Thermo Fisher Scientific)
- Gene Ruler 1 kb DNA Ladder (SM0312, Thermo Fisher Scientific)

6 Metody

6.1 Kultivace a disociace

Kultura XtTSC, XtTSCc, XtTSC-RFP a XtTSCc-RFP byla kultivována při 29,5°C a 5,5% atmosféře CO_2 . Kultivační médium bylo měněno 2x týdně. Buňky byly standardně pasážovány pomocí roztoku papainu 1x týdně. Nejdříve bylo z kultivační lahve odsáto médium a poté byl aplikován roztok papainu na dobu 5 – 15 min. Suspenze byla přenesena do zkumavky a za stálého pipetování byly rozrušeny kolonie XtTSCc, popř. XtTSCc-RFP. Účinky papainu byly poté inhibovány přidáním dostatečného množství média s FBS. Disociovaná jednobuněčná suspenze byla centrifugována (5 min při 110x g) a po odstranění supernatantu byl pelet resuspendován v čerstvém kultivačním médiu pro inokulaci.

6.2 Příprava jednobuněčné suspenze

Na buňky v kultivační nádobě byl po odsátí média aplikován roztok trypsinu, který je uvolnil od povrchu. Kolonie buněk byly od jednotlivých XtTSC, popř. XtTSC-RFP poté tříděny pomocí sítka o velikosti oka 20 μm . Pro disociaci kolonií byl použit roztok papainu a za stálého pipetování byla vytvořena jednobuněčná suspenze XtTSCc, popř. XtTSCc-RFP. Po centrifugaci (5 min, 110x g) a odstranění supernatantu byly buňky resuspendovány v čerstvém médiu a byl určen jejich počet a viabilita pomocí přístroje Countess™ II FL Automated Cell Counter dle instrukcí výrobce.

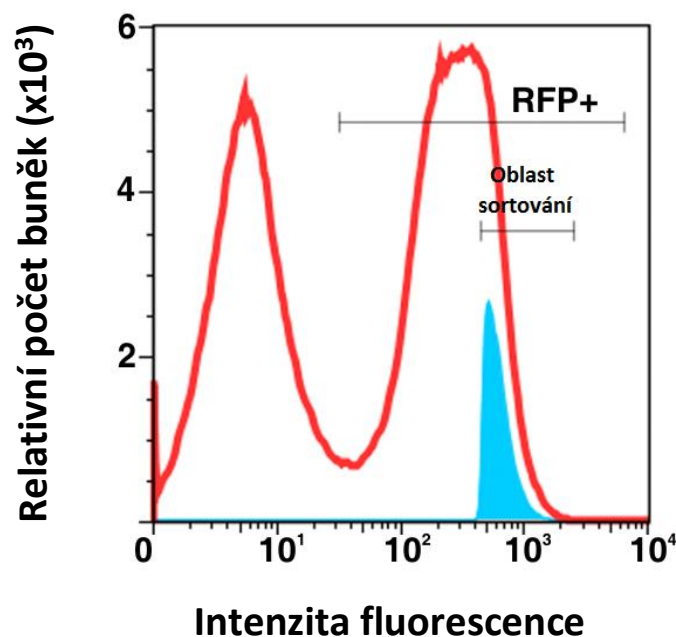
6.3 Růstová křivka

Po dlouhodobé kultivaci byly XtTSC nasazeny v počtu 100 000 živých buněk na kultivační lahve o stejném obsahu a kultivovány v médiu s nebo bez mLIF. Buňky byly kultivovány po dobu 45 dní a každý patnáctý den byly připraveny jednobuněčné suspenze XtTSC a XtTSCc a spočítány na přístroji Countess® Automated Cell Counter. Průměrné hodnoty byly použity k sestrojení růstové křivky u obou typů buněk dohromady a pro XtTSCc odděleně.

6.4 FACS

Separace buněk na základě fluorescenčního signálu (FACS - Fluorescence-Activated Cell Sorting) je metoda, při níž se využívá průtokového cytometru. Na základě specifického rozptylu světla a fluorescenčních vlastností každé buňky dochází k oddělování vybraných populací buněk.

V Laboratoři vývojové biologie PřF UK byla připravena transgenní linie XtTSC exprimující Katushka RFP pod CAG promotorem. Na základě RFP signálu byla pomocí FACS oddělena 3 – 5% populace vykazující nejvyšší intenzitu signálu (Obr. 4), která byla dále kultivována jako XtTSC-RFP.



Obr. 4 Reprezentativní graf sortování pomocí FACS. Na základě nejintenzivnějšího fluorescenčního signálu RFP byla separována populace XtTSC-RFP (modrá oblast).

6.5 Izolace RNA, čištění DNázou, příprava cDNA

Izolace RNA včetně použití DNázy byla provedena pomocí sad chemikálií RNeasy® Mini Kit (74104; Qiagen), popř. RNeasy® Micro Kit (74004; Qiagen) a RNase-Free DNase Set (79254; Qiagen) dle instrukcí výrobce. Koncentrace izolované RNA byla měřena na přístroji Nanodrop při vlnové délce 260 nm. Následně byly z izolovaných RNA vytvořeny jednovláknové komplementární DNA (cDNA) za použití RevertAid H Minus FirstStrand cDNA Synthesis Kit (K1632; ThermoScientific) dle instrukcí výrobce (Tab. 1). Vstupní koncentrace izolované RNA byla pro každou reakci 200 ng.

Krok		Množství
1.	RNA	200 ng
	Oligo(dT)	1 µl
	sterilní H ₂ O	do 12 µl
INKUBACE	70°C	5 min
2.	5x reakční pufr	4 µl
	Ribonukleázový inhibitor	1 µl
	10 mM dNTP mix	2 µl
INKUBACE	37°C	5 min
3.	Reverzní transkriptáza	1 µl
	(V případě negativní kontroly: sterilní H ₂ O)	1 µl
FINÁLNÍ OBJEM		20 µl
INKUBACE	42°C	60 min
	70°C	10 min

Tab. 1 Postup přípravy cDNA z izolované RNA.

6.6 RT-PCR

Sekvence genů byly vyhledány pomocí databáze Xenbase (www.xenbase.org) a Ensembl (www.ensembl.org). Pro návržení primerů byl použit program Primer 3 v. 0.4.0 (www.bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/). Pro pozitivní kontrolu templátu byl použit standardně gen *odc1*. Jako negativní kontrola templátu byla z každé izolované RNA vytvořena cDNA bez použití reverzní transkriptázy z důvodu vyloučení možné kontaminace genomickou DNA. Negativní kontrolou míchaných směsí PCR byl vždy jeden vzorek bez použití templátu. Obě dvě chybějící složky byly nahrazeny příslušným množstvím vody. Podmínky PCR jsou uvedeny v tabulce 2.

Složky reakční směsi:

- 37,5 µl H₂O
- 5 µl 10x Taq pufru s KCl (Thermo Fisher Scientific)
- 3 µl 25 mM MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific)
- 1 µl 10 µM předního primeru (F)
- 1 µl 10 µM zadního primeru (R)
- 1 µl 10 mM dNTP Mix (Thermo Fisher Scientific)
- 1 µl templátu (ss cDNA)
- 0,5 µl Taq DNA polymerázy 5 U/µl (EP0402, Thermo Fisher Scientific)

Krok	Počet cyklů	Teplota	Čas
Horký start reakce	1	94°C	1 min
Denaturace	35	94°C	30 sek
Nasedání primerů		60°C	1 min
Extenze primerů		72°C	1 min 30 sek
Konečná extenze	1	72°C	5 min

Tab. 2 Podmínky PCR.

Výsledky PCR amplifikace byly detekovány na agarózovém gelu obsahujícím etidium bromid. Vzorky reakčních směsí byly obarveny bromfenolovou modří (3 μ l BFM na 10 μ l reakční směsi), nanесeny na 1,5% agarózový gel a následně analyzovány pomocí elektroforetické separace nukleových kyselin.

6.7 Diferenciace

6.7.1 Metoda Hanging drop (metoda zavěšené kapky)

Metoda „Hanging drop“ spočívá v kultivaci kmenových buněk v zavěšené kapce s médiem bez mLIF (v našem případě byla u některých pokusů o diferenciaci vyzkoušena i přítomnost mLIF). Před samotnou metodou je nutné připravit jednobuněčnou suspenzi z XtTSCc, popř. XtTSCc-RFP (viz kap. 6.2).

Po určení počtu živých buněk v suspenzi, byla suspenze ředěna na různé koncentrace buněk. Z jednotlivých suspenzí pak byly vytvořeny 20 μ l kapky na vnitřní stranu víčka Petriho misky, které bylo následně otočeno o 180° s cílem dosáhnout vzniku embryoidních tělísek (EBs). Na dno misky byl vždy přidán 2/3 PBS pro zachování humidity (v případě 6 cm Petriho misky bylo přidáno 2-3 ml 2/3 PBS).

3. den kultivace byl použit odpovídající počet 96-jamkových destiček s kulatým hydrofobním dnem (pro zabránění adheze EBs k povrchu), kam byla jednotlivá EBs přenesena a kultivována po dobu 72 h v médiu bez mLIF, popř. s mLIF (180 μ l na jednu jamku s jedním EBs).

6. den byly připraveny 12-jamkové destičky se sklíčky o průměru 18 mm, jejichž povrch byl pokryt buď želatinou (viz kapitola 6.6.2) nebo poly-L-lysinem (viz kapitola

6.6.3). Jednotlivá EBs pak byla přenesena z 96-jamkových destiček na sklíčka a kultivována v 1 ml média bez mLIF, popř. s mLIF.

V případě indukce diferenciaci bylo 7. či 8. den vyměněno médium bez mLIF, popř. s mLIF za příslušné diferenciacní médium.

6.7.2 Úprava povrchu sklíček želatinou

Na jednotlivá sklíčka ve 12-jamkové destičce bylo použito 10 – 20 μ l 2% želatiny v PBS. Destička byla položena na topnou desku s teplotou mezi 37 – 40 °C nejméně na 2 h. Poté byla destička uchovávána při 4 °C. Želatinou pokrytá sklíčka byla připravena vždy 2 dny před jejich použitím.

6.7.3 Úprava povrchu sklíček poly-lysinem

Na jednotlivá sklíčka v 12-jamkové destičce bylo použito 200 μ l poly-L-lysinu. Destička byla položena na topnou desku s teplotou mezi 37 – 40 °C na dobu 30 min. Poly-L-lysin byl následně odstraněn a jednotlivé jamky byly 2x opláchnuty deionizovanou H₂O.

6.7.4 Spontánní diferenciaci

6.7.4.1 Pokus č. 1

V prvním pokusu o spontánní diferenciaci byla metodou „Hanging drop“ vytvořena EBs o počtu 3000 XtTSCc. Kultivace připravených EBs probíhala v médiu bez mLIF po dobu 48 h na sklíčkách potažených želatinou. Při vyhodnocování pokusu o spontánní diferenciaci byly použity tyto primární protilátky: 1E12, D7F2, TBX20, 14h7 (anti-vimentin) a zn12; a sekundární protilátky Alexa 488 anti-mouse (D7F2, 14h7 a zn12), Alexa 555 anti-mouse (1E12) a Alexa 488 anti-rabbit (TBX20).

6.7.4.2 Pokus č. 2

V tomto pokusu byla EBs vytvořena z většího počtu buněk a to 6000 XtTSCc a XtTSCc-RFP metodou „Hanging drop“. Kultivace připravených EBs probíhala v médiu bez mLIF po dobu 15 dní na sklíčkách potažených želatinou, kdy každý 3. den bylo médium vyměněno za čerstvé. Vzhledem k tomu, že v publikovaných protokolech buňky EBs většinou spontánně diferencovaly v kardiomyocyty, byly při vyhodnocování pokusu použity primární protilátky anti-Troponin T a TBX20, neboli protilátky proti proteinům

specifických pro srdeční svalovinu. V případě anti-Troponinu T byla použita sekundární protilátka Alexa 488 anti-mouse, pro TBX20 Alexa 488 anti-rabbit.

6.8 Indukovaná diferenciac

6.8.1 Diferenciac v kardiomyocyty

6.8.1.1 Pokus č. 1

Pomocí metody „Hanging drop“ byla připravena EBs pouze z XtTSCc-RFP o celkovém počtu 3000 a 6000 buněk na jedno tělísko. Po přenesení všech EBs na sklíčka upravená poly-L-lysinem, bylo následující den použito DMAA se všemi zmíněnými koncentracemi AA, tedy 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} . Médium s DMAA bylo měněno každý třetí den po 12 dní. Při vyhodnocování byly použity primární protilátky D7F2, TBX20 a anti-Sma pro všechny zmíněné koncentrace AA a sekundární protilátky Alexa 488 anti-mouse (v případě D7F2 a anti-Sma) a Alexa 488 anti-rabbit (v případě TBX20).

6.8.1.2 Pokus č. 2

Při druhém pokusu byly testovány XtTSCc-RFP ve třech různých formách. Nejříve byla metodou „Hanging drop“ vytvořena EBs z 3000 buněk (případ I) a 6000 buněk (případ II), která byla přenesena na sklíčka pokrytá poly-L-lysinem. V ten samý den bylo 2000 buněk z připravené jednobuněčné suspenze XtTSCc-RFP (případ III) inokulováno na sklíčka také pokrytá poly-L-lysinem. V případech II a III byly vždy zároveň kultivovány buňky bez vlivu DMAA jako negativní kontrola pokusu. Pro kontrolu imunocytochemické analýzy (viz kap. 6.9) byly připraveny ty samé vzorky buněk, kdy při barvení nebyly aplikovány primární protilátky, ale pouze sekundární protilátky. Z předešlého pokusu č. 1 byla vybrána jediná koncentrace AA a to 10^{-3} . Pod vlivem DMAA byl kultivován stav II a III vyjma negativních kontrol, na které bylo použito médium bez mLIF. Média byla měněna každý 3. den po dobu 12 dní a posléze bylo provedeno imunocytochemické vyhodnocení. Byly použity primární protilátky D7F2, anti-troponin T, anti-tropomyosin, anti-fibronektin, TBX20, anti-Sma a anti-Sox9 se 14h7 (anti-vimentin) pro duální barvení. Pro TBX20 a anti-Sox9 byla použita Alexa 488 anti-rabbit jako sekundární protilátka, v ostatních případech se jednalo o Alexa 488 anti-mouse. Pro stavy I, II a III byly také kultivovány buňky na izolaci RNA a navazující RT-PCR analýzu.

6.8.1.3 Pokus č. 3

Ve třetím pokusu byly použity kromě XtTSCc-RFP i XtTSCc, ze kterých byla pomocí „Hanging drop“ vytvořena EBs o počtu 6000 buněk na tělísko. Kultivace probíhala pod vlivem DMAA s koncentrací AA 10^{-4} na sklíčkách potažených želatinou po dobu 14 dní. Negativní kontrola byla kultivována v médiu bez mLIF. Obě média byla vyměňována každý třetí den. Při imunocytologickém barvení byly použity protilátky anti-troponin T a TBX20 se sekundárními protilátkami Alexa 488 anti-mouse (anti-troponin T) a Alexa 488 anti-rabbit (TBX20).

6.8.2 Diferenciace v adipocyty

6.8.2.1 Pokus č. 1

V 1. pokusu byly použity XtTSCc-RFP pro vytvoření EBs o velikosti 6000 buněk, která byla přenesena na Petriho misky o průměru 6 cm. Zároveň byla kultura XtTSC-RFP s narostlými koloniemi standardně disociována pomocí roztoku papainu a z této suspenze bylo inokulováno 2000 buněk na Petriho misky o stejném průměru. EBs a buňky směřované k diferenciaci byly celou dobu kultivace pod vlivem diferenciačního média StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit a to buď bez mLIF či s mLIF. U negativní kontroly bylo použito DMEM bez mLIF nebo s mLIF. Některé EBs a buňky pod vlivem StemPro® Adipogenesis Differentiation Kitu byly na závěr protokolu použity k izolaci RNA. Média byla měněna každé 3 dny po dobu 12 dní. K potvrzení diferenciace byly EBs a buňky histologicky barveny olejovou červení O (viz kap. 6.9.1).

6.8.2.2 Pokus č. 2

Ve 2. pokusu byla použita kultura XtTSC s narostlými koloniemi, která byla disociována pomocí roztoku papainu. Z této suspenze bylo nasazeno 2000 buněk na Petriho misky o průměru 6 cm. Tyto buňky byly kultivovány pod vlivem média StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit s mLIF. Zároveň byly buňky kultivovány v kondiciovaném médiu, kdy při každé výměně média byla polovina média odebrána a doplněna druhou polovinou čerstvého diferenciačního média. Negativní kontrola byla kultivována pod vlivem DMEM s mLIF. Byly připraveny vzorky jak na histologické barvení, tak na izolaci RNA. Média byla měněna každé 4 dny po dobu 21 dní. Histologické barvení bylo provedeno pomocí olejové červeně O.

6.8.2.3 Pokus č. 3

Ve 3. pokusu byly použity jak XtTSC, tak XtTSC-RFP s narostlými koloniemi, které byly disociovány pomocí roztoku papainu. Ze suspenzí bylo odebráno 2000 buněk na negativní kontrolu a 100 000 buněk pro indukci diferenciaci *in vitro* pomocí kondiciovaného média bez mLIF ze StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit. Negativní kontrola byla kultivována v DMEM bez mLIF. Po inokulaci na 6-jamkovou destičku byly buňky ponechány 48 h v DMEM bez mLIF. Posléze bylo médium vyměněno za médium ze StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit. Média byla měněna každé 4 dny po dobu 16 dní. Byly připraveny vzorky na histologické barvení a izolaci RNA. Histologické barvení bylo provedeno pomocí olejové červeně O.

6.8.3 Diferenciaci v chondroblasty

6.8.3.1 Pokus č. 1

V 1. pokusu byla standardně disociována kultura XtTSC i XtTSC-RFP s narostlými koloniemi. Ze suspenzí bylo odebráno 2000 buněk na negativní kontrolu a 100 000 buněk pro indukci diferenciaci *in vitro* pomocí StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit. Buňky negativní kontroly byly kultivovány v DMEM bez mLIF. Po inokulaci na 6-jamkové destičky byly buňky 48 h ponechány v DMEM bez mLIF a poté bylo médium vyměněno za diferenciacní médium bez mLIF ze StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit. V rámci další výměny média (každé 4 dny) bylo vždy připraveno kondiciované diferenciacní médium bez mLIF. Z důvodu vysoké úmrtnosti buněk byl pokus zkrácen pouze na 6 dní kultivace. Byly připraveny vzorky na histologické barvení a izolaci RNA. Histologické barvení bylo provedeno pomocí alcianové modři (viz kap. 6.9.2).

6.8.3.2 Pokus č. 2

Ve druhém pokusu bylo použito 500 000 XtTSC i XtTSC-RFP na sklíčko pod vlivem média bez mLIF ze StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit. Zároveň byla připravena i negativní kontrola, která byla kultivována v DMEM bez mLIF. Kultivace trvala 5 dní. Při imunocytoologickém barvení byla použita primární protilátka CIIC1 a sekundární protilátka Alexa 488 anti-mouse.

6.8.4 Diferenciace v osteoblasty

6.8.4.1 Pokus č. 1

V 1. pokusu bylo pro indukci diferenciace *in vitro* použito DMADG bez mLIF i s mLIF. Negativní kontrola byla ponechána v médiu bez mLIF, popř. s mLIF. Nejdříve byla metodou „Hanging drop“ vytvořena EBs z 6000 XtTSCc-RFP a jednobuněčná suspenze XtTSCc-RFP, ze které bylo použito 2000 buněk na sklíčko. Následující den byla v případě indukce diferenciace v médiu bez mLIF, popř. s mLIF vyměněna za DMADG bez mLIF, popř. s mLIF. U negativních kontrol bylo médium bez mLIF, popř. s mLIF vyměněno za čerstvé. Všechna 4 média byla měněna každý čtvrtý den po dobu 16 dní. Zda buňky diferencovaly do osteoblastů, bylo analyzováno histologickým barvením kalciových depozit alizarinovou červení (viz kap. 6.9.3). RNA byla izolována z EBs i z buněk rostoucích v monolayeru pod vlivem DMADG s mLIF, popř. bez mLIF.

6.8.4.2 Pokus č. 2

Ve 2. pokusu bylo připraveno 6 Petriho misek o průměru 6 cm, z toho 3 misky byly kultivovány na histologické barvení pomocí alizarinové červeně a 3 misky na izolaci RNA. Zaprvé byla kultivována negativní kontrola pod vlivem DMEM s mLIF, zadruhé byly buňky pod vlivem diferenciačního média s mLIF ze StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit a zatřetí byly buňky kultivovány pod vlivem kondiciovaného média s mLIF ze StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit. XtTSC s narostlými koloniemi byly standardně disociovány a na každou z misek bylo inokulováno 2000 buněk. Dva dny byly vzorky ponechány v DMEM s mLIF a následně bylo médium vyměněno za diferenciační médium s mLIF ze StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit kromě negativních kontrol, kde bylo pouze vyměněno za čerstvé médium. Poté kultivace trvala 16 dní, kdy každé 4 dny bylo médium u všech vzorků vyměněno. K histologickému barvení vápníkových depozit byla použita alizarinová červeně a stejný den byla také izolována RNA.

6.8.4.3 Pokus č. 3

Ve 3. pokusu byla použita jak kultura XtTSC, tak XtTSC-RFP s narostlými koloniemi, které byly standardně disociovány pomocí roztoku papainu. Z těchto buněčných suspenzí bylo na Petriho misky inokulováno 2000 buněk. Buňky byly

kultivovány 48 h v DMEM bez mLIF, které bylo taktéž použito v rámci negativních kontrol. Po dvou dnech bylo ostatním buňkám vyměněno toto médium za diferenciační médium bez mLIF ze StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit. Média byla měněna každé 4 dny. V případě diferenciačního média bylo při každé výměně použito kondicionované médium. Tento diferenciační proces trval 16 dní. Opět byly buňky barveny alizarinovou červení a také jim byla izolována RNA pro analýzu genů specifických pro osteoblasty na úrovni transkripce.

6.8.5 Diferenciace v neuroektoderm

6.8.5.1 Pokus č. 1

Diferenciace směrem k neurální linii byla vyzkoušena na buňkách XtTSCc a XtTSCc-RFP, ze kterých byla pomocí „Hanging drop“ vytvořena EBs o velikosti 6000 buněk. Po přenesení EBs na sklíčka pokrytá poly-L-lysinem byla 24 h kultivována v médiu bez mLIF. Následující den bylo kultivační médium vyměněno za DMRA. Kultivace v DMRA probíhala po dobu 5 dní s jednou výměnou. Negativní kontroly byly kultivovány v médiu bez mLIF. Při imunocytologické analýze byly použity primární protilátky zn12 a NAA se sekundární protilátkou Alexa 488 anti-mouse.

6.9 Histologické barvení

6.9.1 Barvení olejovou červení O

Pro přípravu zásobního roztoku bylo 0,3 g olejové červeně O rozpuštěno ve 100 ml 99% izopropanolu (roztok lze skladovat až 1 rok). Před samotným barvením bylo nutné připravit čerstvý barvicí roztok v poměru 3:2 s destilovanou H₂O, který byl po 10 min klidu filtrován přes filtrační papír (roztok lze skladovat pouze 3 h). Buňky byly fixovány pomocí roztoku 3,8% formaldehyd ve 2/3 PBS po dobu 20 min a 3 x 5 min opláchnuty ve 2/3 PBS. Poté byly buňky inkubovány 5 min v 60% izopropanolu a barveny 15 min roztokem olejové červeně O, který byl na závěr omyt destilovanou H₂O.

6.9.2 Barvení alciánovou modří

Po fixaci 3,8% formaldehydem byly buňky barveny 1% alciánovou modří v 0,1 M HCl po dobu 30 minut. Následně byly buňky třikrát opláchnuty 0,1 M HCl. Na závěr byla přidána destilovaná H₂O k neutralizaci vzorku.

6.9.3 Barvení alizarinovou červení S

Pro přípravu čerstvého 2% roztoku alizarinové červeně byl rozpuštěn 1 g barvičky v 50 ml deionizované H₂O. Dobře promíchaný roztok byl filtrován přes filtrační papír a pH bylo upraveno na hodnotu 4,1 až 4,3 pomocí 0,5% NH₄OH, popř. HCl.

Před barvením byly buňky fixovány 20 min v 3,8% formaldehydu v 2/3 PBS a následně opláchnuty 3 x 5 min v 2/3 PBS. Buňky byly barveny 20 min připraveným roztokem alizarinové červeně a poté dostatečně promyty destilovanou H₂O dokud nebyl promývaný roztok čirý.

6.10 Imunocytoologické barvení

Krycí sklíčka s buňkami byla opláchnuta a následně fixována ve 3,8% roztoku formaldehydu po dobu 20 minut. Poté byla sklíčka 3 × 5 min promyta. Po promytí byly buňky 5 min inkubovány v 15mM NH₄Cl a opět následoval 3 × 5 min oplach. Působením 0,5% roztoku Tritonu X-100 po dobu 2 min došlo k permeabilizaci buněk a opět následoval oplach 3 × 5 min. Sklíčka byla posléze 45 min inkubována v 2% BSA, aby došlo k omezení nespecifických interakcí. Pak byla aplikována primární protilátka ředěná v 0,5% BSA a sklíčka byla inkubována ve vlhké komůrce přes noc. Druhý den byla sklíčka promyta 5 × 5 min a pro vizualizaci signálu byly použity sekundární protilátky ředěné v 0,5% BSA. Inkubace buněk se sekundární protilátkou probíhala 90 min v temné komůrce. Poté byla sklíčka znovu opláchnuta 5 × 5 min a montována na podložní skla pomocí Mowiol/DAPI pro vizualizaci jader buněk. Pro všechny oplachy a roztoky uvedené v tomto protokolu byl použit roztok 2/3 PBS.

7 Výsledky

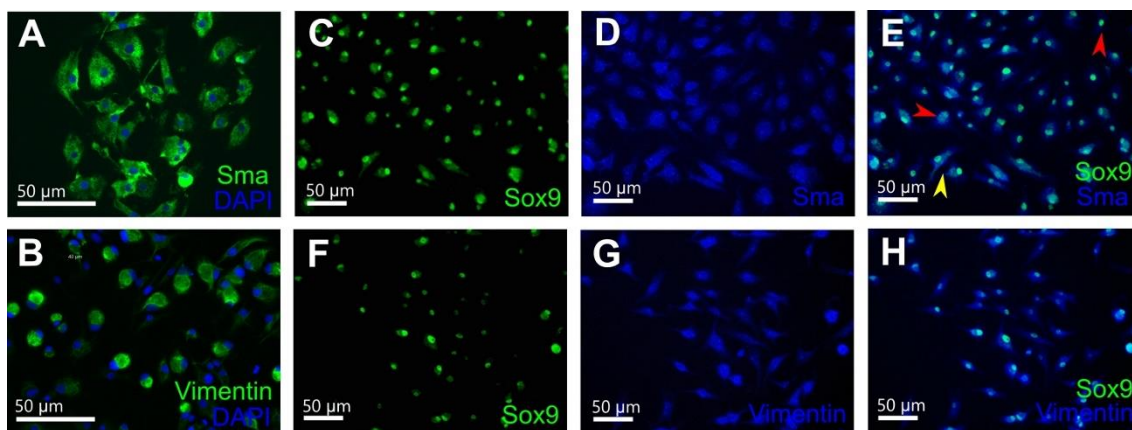
7.1 Charakteristika XtTSC

Testikulární buněčná kultura *X. tropicalis* vytvářela od svého založení monolayer adherentně rostoucích buněk XtTSC. Dlouhodobou kultivací docházelo k formování kolonií (XtTSCc) na podpůrné vrstvě XtTSC vykazující morfologickou podobnost s koloniemi ESCs. Analýza RT-PCR odhalila podobný expresní profil obou typů buněk. XtTSC a XtTSCc byly pozitivní pro geny pluripotence *klf4*, *c-myc* a *tert*. Na druhou stranu byly buňky negativní v dalších genech pluripotence *POU5F1* (u *X. tropicalis* se jedná o ortology *pou5f3.1*, *pou5f3.2* a *pou5f3.3*) (Morrison & Brickman 2006; Holland et al. 2007) či *sox2*, což naznačuje, že tyto buňky nevykazují pluripotentní potenciál. Klíčovým genem pluripotence je i gen *nanog* (Silva et al. 2009), jehož homolog však nebyl doposud popsán v modelovém organismu *Xenopus*. Expresí genů zárodečných buněk jako jsou *dazl*, *ddx4* a *ddx25* nebyla v XtTSC a XtTSCc potvrzena. Tento výsledek jednoznačně dokázal somatický původ XtTSC a XtTSCc. Podrobnější charakterizace XtTSC a XtTSCc zahrnuje i expresní analýzu genů typických pro Sertoliho buňky (*sox9*, *kitlg* a *vimentin*), peritubulární myoidní buňky (*acta2* a *lif*), Leydigovy buňky (*cyp11a1* a *cyp17a1*) a geny typické pro mezenchymální kmenové buňky (*itgb1*-*cd29*, *cd44* a *thyl-cd90*). Až na geny typické pro Leydigovy buňky, vykazovaly oba typy buněk pozitivní expresi výše zmíněných genů. Součástí expresní analýzy bylo i vyhodnocení exprese všech zmíněných genů u transgenní linie XtTSC-RFP a XtTSCc-RFP exprimující Katushka RFP pod CAG promotorem (Tab. 3).

Symbol genu	Název genu	Transkript genu	Expresse genu				
			varlata	XtTSC	XtTSCc	XtTSC-RFP	XtTSCc-RFP
Geny typické pro pluripotentní buňky							
<i>klf4</i>	Kruppel-like factor 4	ENSXETT00000012646					
<i>myc</i>	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog	ENSXETT000000054171					
<i>pou5f3.1</i>	POU class 5 homeobox 3, gene 1	NM_001285474					
<i>pou5f3.2</i>	POU class 5 homeobox 3, gene 2	NM_001129934					
<i>pou5f3.3</i>	POU class 5 homeobox 3, gene 3	NM_001130364					
<i>sox2</i>	SRY (sex determining region Y) - box 2	ENSXETT000000004031					
<i>tert</i>	telomerase reverse transcriptase	ENSXETT000000034113					
Geny typické pro SSCs							
<i>dazl</i>	deleted in azoospermia-like	NM_203748					
<i>ddx4</i>	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4	ENSXETT000000066339					
<i>ddx25</i>	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 25	ENSXETT000000064463					
Geny typické pro MSCs							
<i>itgb1</i>	integrin, beta 1 (antigen CD29 includes MDF2)	ENSXETT000000048743					
<i>cd44</i>	CD44 molecule (Indian blood group)	ENSXETT000000016456					
<i>thy1</i>	Thy-1 cell surface antigen	ENSXETT000000046686					
Geny typické pro buňky varlat							
<i>acta2</i>	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	ENSXETT000000020391					
<i>cyp11a1</i>	cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1	ENSXETT000000011263					
<i>cyp17a1</i>	cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide 1	ENSXETT000000033323					
<i>kitlg</i>	KIT ligand ~ Stem Cell Factor	NM_001045596					
<i>lif</i>	leukemia inhibitory factor	ENSXETT000000053337					
<i>sox9</i>	SRY (sex determining region Y) - box 9	ENSXETT000000048344					
<i>vim</i>	vimentin	ENSXETT000000016267					
Kontrolní gen							
<i>odc1</i>	ornithine decarboxylase 1	ENSXETT000000007603					

Tab. 3 RT-PCR analýza vybraných genů u varlete *X. tropicalis*, XtTSC, XtTSCc, XtTSC-RFP a XtTSCc-RFP (převzato a upraveno dle Tlapakova et al. 2016).

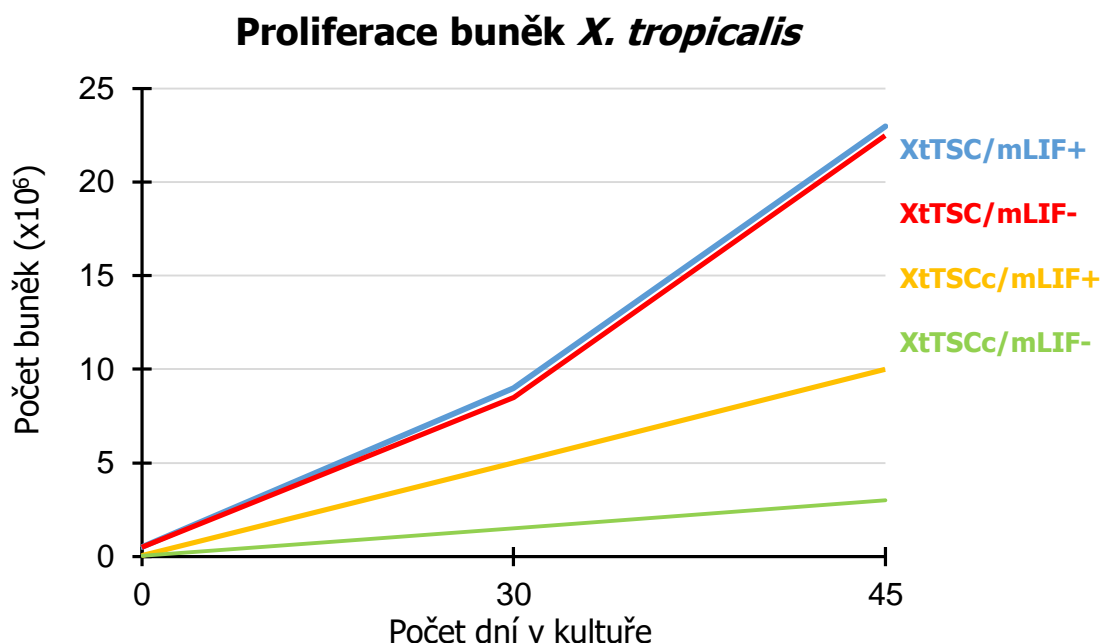
V rámci charakterizace XtTSC, popř. XtTSC-RFP bylo také provedeno imunofluorescenční barvení protilátkami proti Sma, vimentinu a Sox9, které odhalilo jejich kolokalizaci na více než 80 % buněk (Obr. 5). Z těchto výsledků vyplývá, že testikulární buněčná kultura *X. tropicalis* představuje populaci společných progenitorů SCs a PTMCs. Uvedené výsledky byly shrnuty a zveřejněny v recenzovaném časopisu (Tlapakova et al. 2016 - Příloha B).



Obr. 5 Imunocytochemická analýza XtTSC-RFP. Při charakterizaci testikulární buněčné kultury *X. tropicalis* exprimující Katushka RFP byly použity protilátky proti Sma, Vimentinu a Sox9: **A)** pozitivní barvení Sma, **B)** pozitivní barvení Vimentinu. Jádra jsou barvena pomocí DAPI (modře). **C-E)** Dvojití barvení Sox9 (zeleně) (**C**) a Sma (modře) (**D**), **E**) merge C a D. Žluté šipky poukazují na buňky exprimující oba antigeny. Červené šipky ukazují buňky exprimující pouze Sox9 či Sma. **F-H)** Dvojití barvení Sox9 (zeleně) (**F**) a Vimentinu (modře) (**G**), **H**) merge F a G. Měřítka reprezentují 50 µm (převzato a upraveno dle Tlapakova et al. 2016).

7.2 Růstová křivka

Dlouhodobá kultivace XtTSC v médiu s mLIF podpořila proliferaci buněk a rychlejší formování kolonií (XtTSCc) (obr. 6).

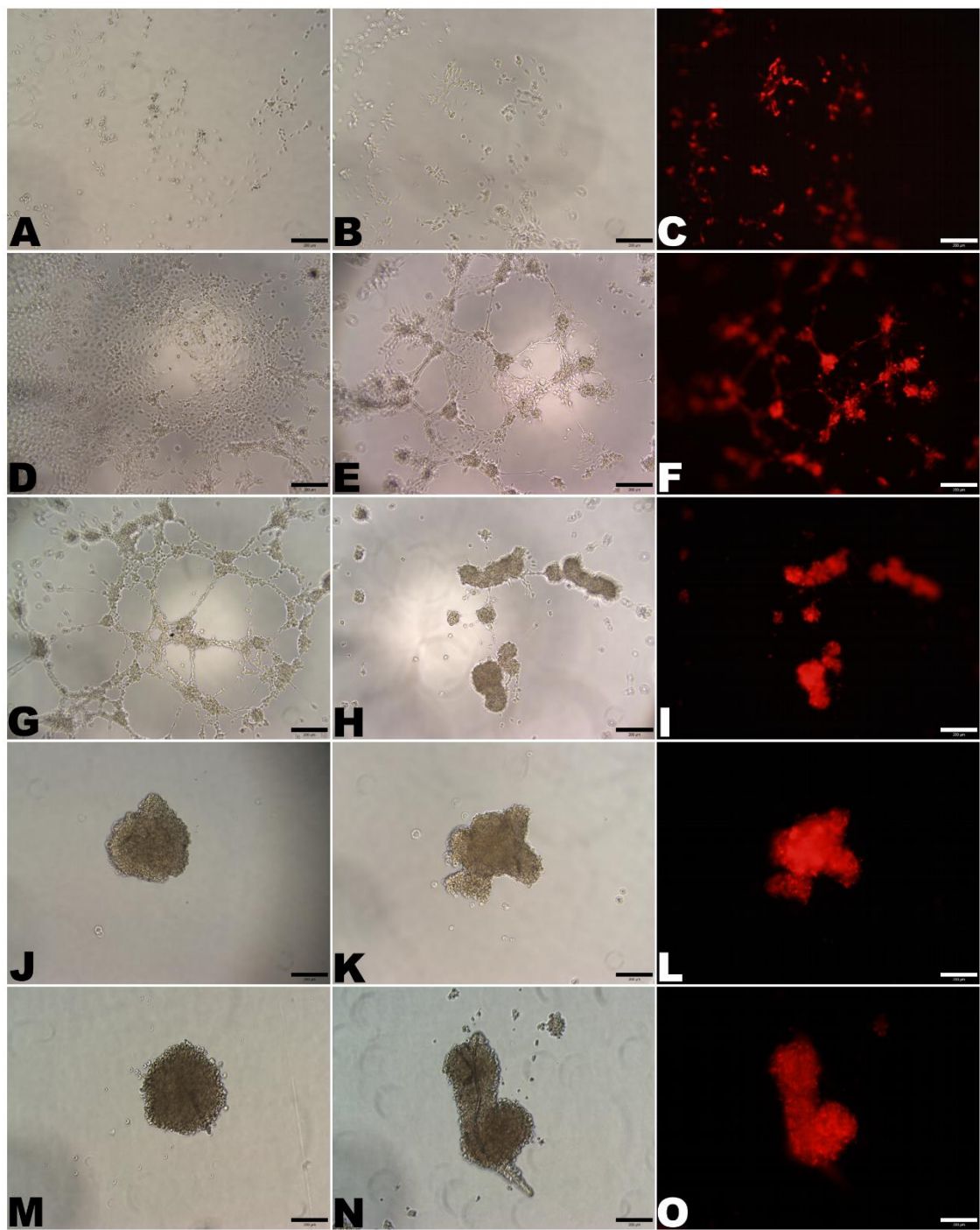


Obr. 6 Dlouhodobá kultivace testikulárních somatických buněk *X. tropicalis*. mLIF+ značí přítomnost mLIF v kultivačním médiu, mLIF- značí nepřítomnost mLIF v kultivačním médiu (převzato a upraveno dle Tlapakova et al. 2016).

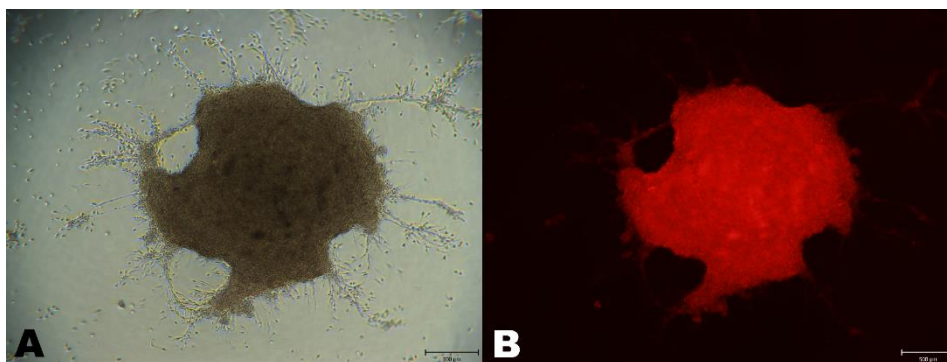
7.3 Standardizace metody Hanging drop

Metoda „Hanging drop“ neboli metoda zavěšené kapky, byla navržena a standardizována za účelem formování trojrozměrných agregátů zvaných EBs.

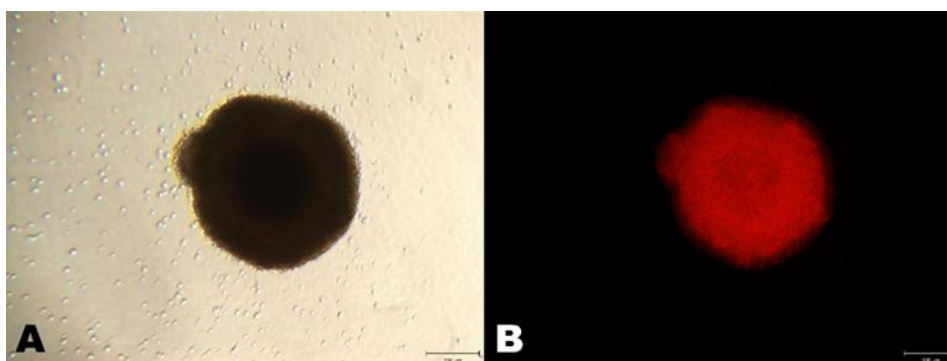
Během standardizace protokolu v případě kultury XtTSCc, popř. XtTSCc-RFP bylo zjištěno, že nízký počet buněk (400-500) nevede k vytvoření EBs. EBs z 1000 XtTSCc, popř. XtTSCc-RFP byla zformována nejdříve po 5 dnech kultivace v zavěšené kapce (Obr. 7). Vzhledem k tomu, že ale kultivace EBs v zavěšené kapce probíhá pouze dva dny z důvodu použití velmi nízkého množství média na výživu buněk, byl ustanoven minimální počet buněk pro vytvoření EB na 3000 XtTSCc, popř. XtTSCc-RFP. V rámci některých pokusů o spontánní a indukovanou diferenciaci byl však použit vyšší počet buněk a to 6000 XtTSCc, popř. XtTSCc-RFP, jelikož při nižším počtu buněk nevytvářela populace XtTSC-RFP tak souměrná EBs jako XtTSCc (Obr. 7). Dále byl vyzkoušen postup s použitím 100 000 XtTSCc-RFP v 20 μ l kapce média. Výsledek ukázal, že jsou XtTSCc-RFP schopné formovat kulatá EBs i z takového množství buněk (Obr. 8 a 9), což bylo potvrzeno i běžným pozorováním v rámci diferenciačních pokusů.



Obr. 7 Metoda „Hanging drop“. Týdenní formování EBs z 1000 XtTSCc (levý sloupec) a 1000 XtTSCc-RFP (prostřední sloupec). V pravém sloupci je ukázán RFP fluorescenční signál XtTSCc-RFP. **A, B, C)** po 1. dnu kultivace; **D, E, F)** po 2. dnu kultivace; **G, H, I)** po 3. dnu kultivace; **J, K, L)** po 5. dnu kultivace; **M, N, O)** po 7. dnu kultivace. Měřítka reprezentují 200 μm .



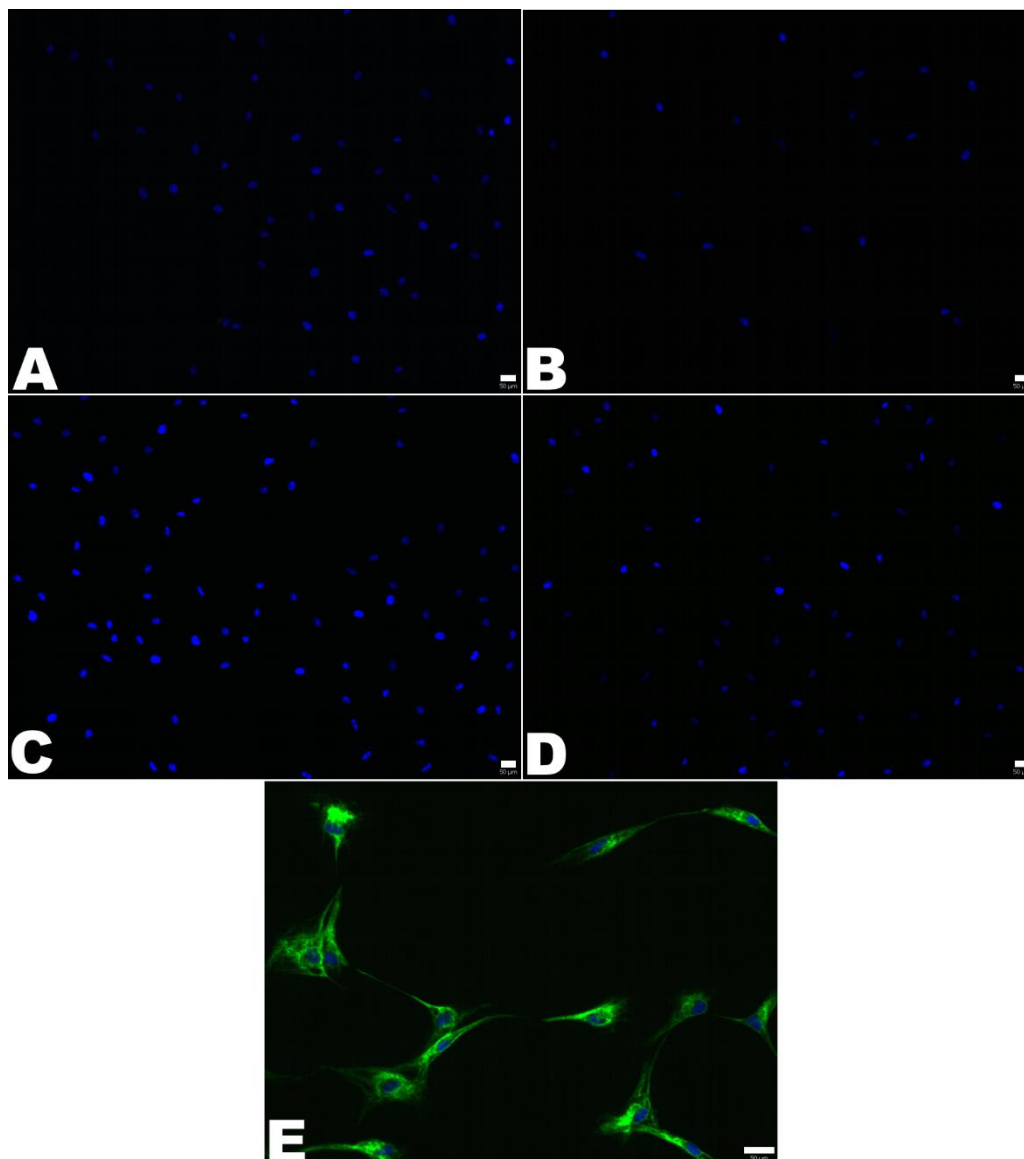
Obr. 8 Formování EB ze 100 000 XtTSCc-RFP po 24 hod. A) procházející světlo, B) RFP fluorescenční signál. Měřítka reprezentuje 500 μ m.



Obr. 9 Formování EB ze 100 000 XtTSCc-RFP po 3. dnu. A) procházející světlo, B) RFP fluorescenční signál. Měřítka reprezentuje 500 μ m.

7.4 Spontánní diferenciaci

Metoda „Hanging drop“, jak již bylo zmíněno výše, je často používanou metodou vedoucí ke spontánní diferenciaci kmenových buněk *in vitro*. V průběhu dvou pokusů provedených v Laboratoři vývojové biologie, však nebyla prokázána spontánní diferenciaci u buněk kultury *X. tropicalis*. Na výsledek spontánní diferenciaci neměl vliv počet buněk, délka kultivace, ani zda se jednalo o EBs z XtTXSCc či EBs z XtTSCc-RFP. Všechny uvedené protilátky z obou pokusů nevykazovaly pozitivní signál s výjimkou protilátky proti vimentinu (Obr. 10). Tento protein typický pro MSCs, Sertoliho buňky a intermediární filamenta je však pozitivní i u standardně kultivované kultury XtTSC i XtTSC-RFP.



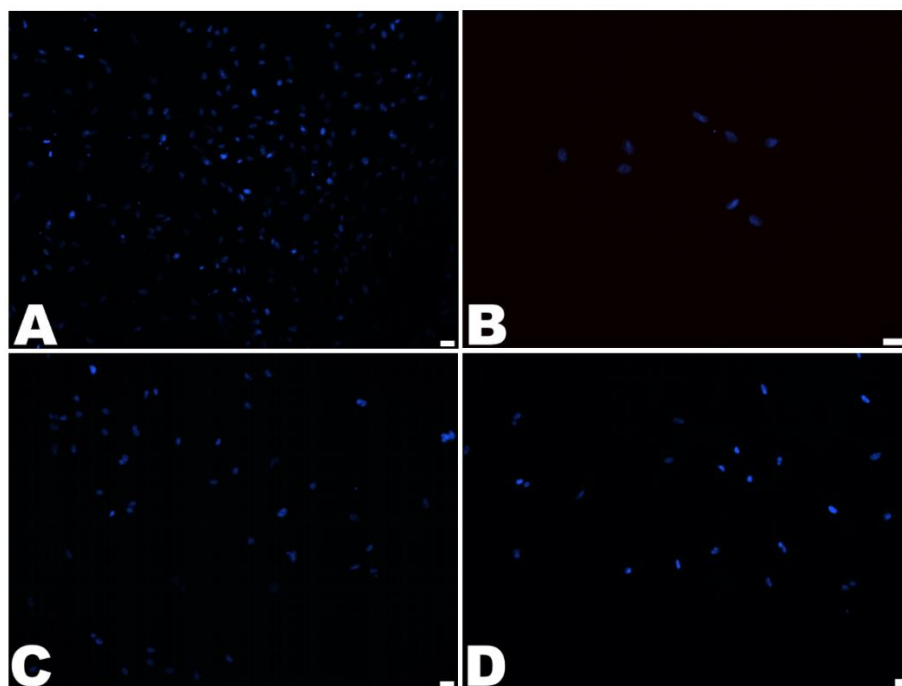
Obr. 10 Spontánní diferenciace *in vitro* u EBs z XtTSCc (pokus č. 1). Imunofluorescenční analýza exprese proteinů: **A)** actinin (zeleně), **B)** myoD (zeleně) **C)** TBX20 (zeleně) **D)** zn12 (zeleně), **E)** vimentin (zeleně). Jádra jsou barvena DAPI (modře). Měřítka reprezentují 50 μm .

7.5 Indukovaná diferenciace

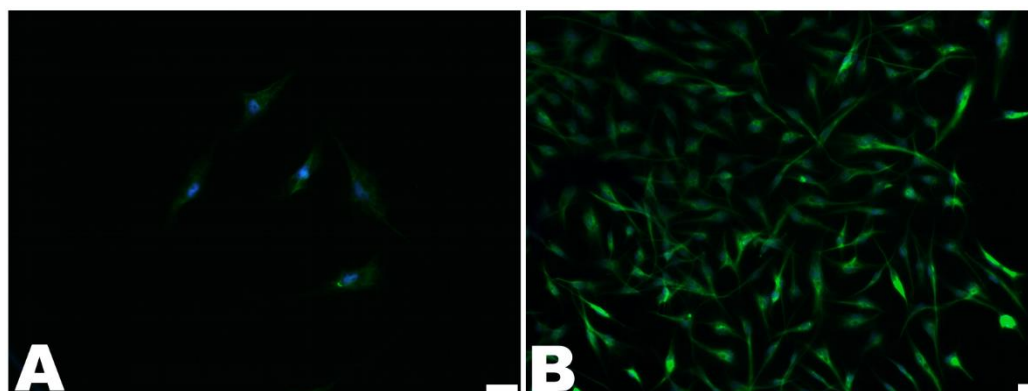
7.5.1 Diferenciace v kardiomyocyty

Kyselina askorbová často indukuje diferenciaci kmenových buněk v kardiomyocyty. Koncentrace AA od 10^{-2} po 10^{-5} v DMAA však neprokázala žádnou změnu XtTSCc ani XtTSCc-RFP v srdeční buňky. Zmíněné protilátky byly negativní (např. TBX20 na obr. 11). Výjimkou byly protilátky proti vimentinu (14h7), Sma (specifické pro myoidní buňky) a Sox9 (specifické pro Sertoliho buňky), což jsou

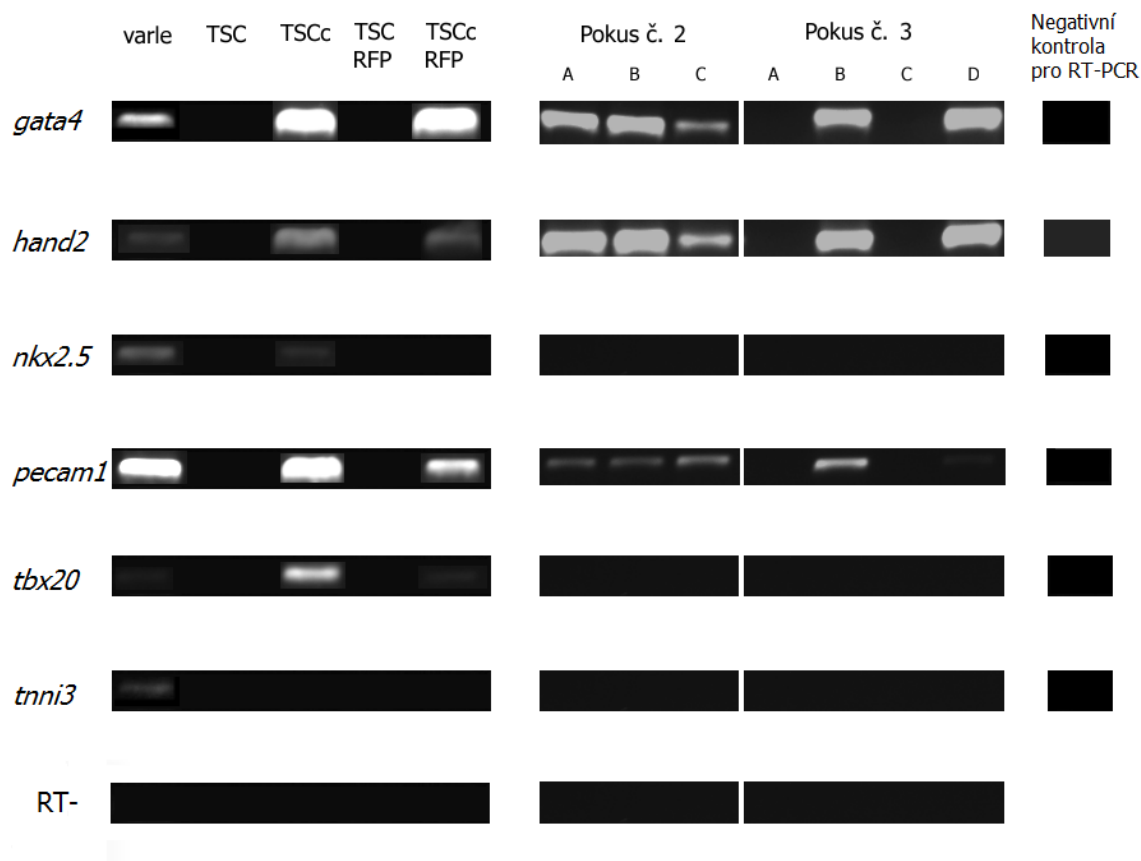
proteiny běžně exprimované v kulturách XtTSC i XtTSC-RFP (Obr. 12). Pomocí analýzy exprese genů typických pro srdeční svalovinu na úrovni RNA, která byla izolována v rámci pokusu č. 2 a 3, taktéž neprokázala diferenciaci v kardiomyocyty (Obr. 13). Ukázalo se, že všechny testované geny byly pozitivní jak před, tak po diferenciaci XtTSCc a XtTSCc-RFP.



Obr. 11 Indukce diferenciaci v kardiomyocyty u EBs z XtTSCc a EBs z XtTSCc-RFP (pokus č. 3). Imunofluorescenční analýza exprese proteinu TBX20 (zeleně): **A)** EBs z XtTSCc, **B)** EBs z XtTSCc-RFP, **C)** negativní kontrola EBs z XtTSCc, **D)** negativní kontrola EBs z XtTSCc-RFP. Jádra jsou barvena DAPI (modře). Měřítka reprezentují 50 μ m.



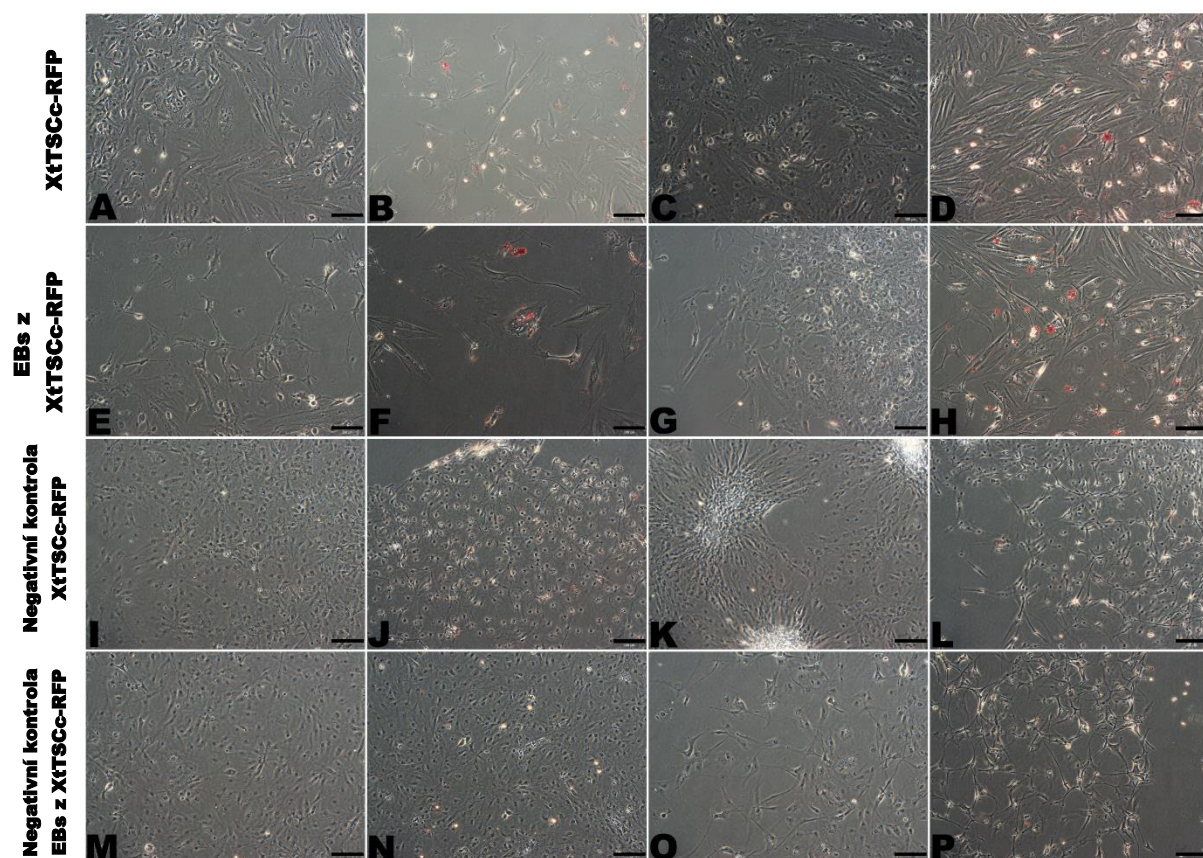
Obr. 12 Indukce diferenciaci v kardiomyocyty u EBs z XtTSCc-RFP (pokus č. 2). Imunofluorescenční analýza exprese proteinů: **A)** Sma (zeleně), jádra jsou barvena DAPI (modře), **B)** Vimentin (zeleně) + Sox9 (modře). Měřítka reprezentují 50 μ m.



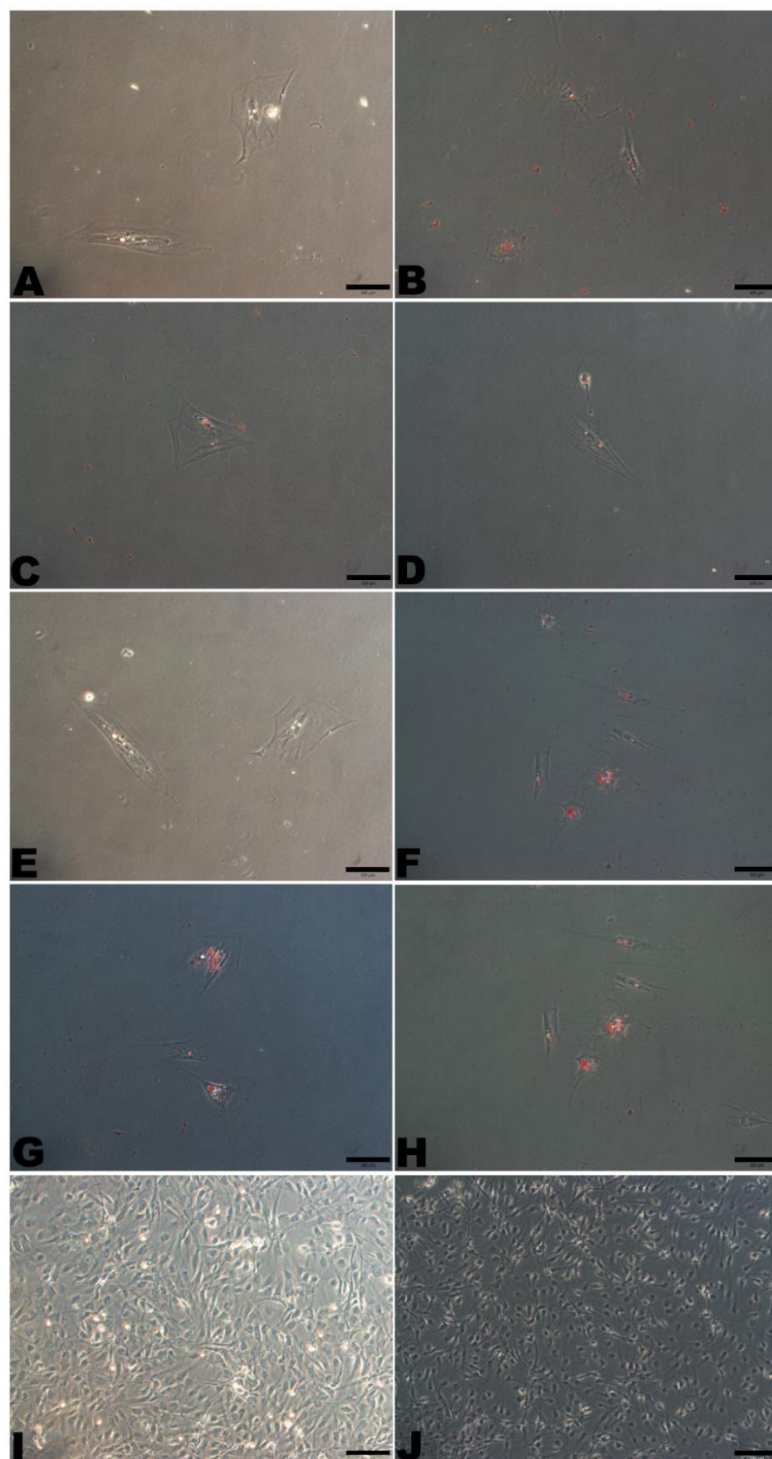
Obr. 13 Analýza genů typických pro kardiomyocyty na úrovni RNA. V pokusu č. 2 byla RNA izolována z EBs z 3000 XtTSCc-RFP (A), EBs z 6000 XtTSCc-RFP (B) a z XtTSCc-RFP rostoucích v monolayeru (C). V pokusu č. 3 byla RNA izolována z EBs z 6000 XtTSCc (A) a z EBs z 6000 XtTSCc-RFP (B). RNA byla izolována také z negativních kontrol bez vlivu DMAA u EBs z XtTSCc (C) a EBs z XtTSCc-RFP (D). RT- reprezentuje negativní kontrolu reverzní transkripce. Negativní kontrola pro RT-PCR představuje reakce připravené bez templátu.

7.5.2 Diferenciace v adipocyty

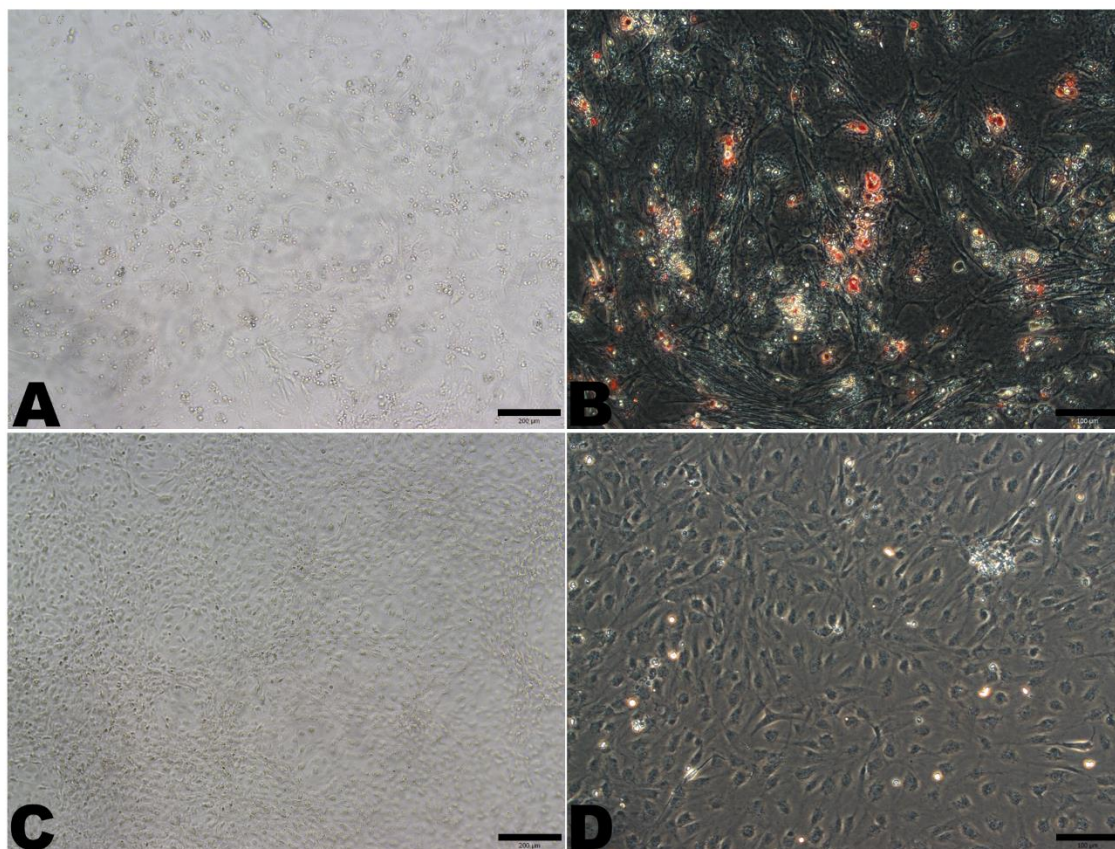
Ve všech výše zmíněných diferenciačních protokolech bylo použito médium ze StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit běžně používané pro MSCs. Pomocí barvení byla prokázána diferenciace v adipocyty jak v pokusu č. 1 (Obr. 14), pokusu č. 2 (Obr. 15), tak v pokusu č. 3 (Obr. 16 a 17). Během pokusu č. 3 se ukázalo, že pro tento typ diferenciace je neoptimálnější kondiciované médium bez mLIF (Obr. 16B). Z pozorování pod světelným mikroskopem bylo zřejmé, že byla diferenciace účinnější u XtTSCc (Obr. 16) ve srovnání s XtTSCc-RFP (Obr. 17).



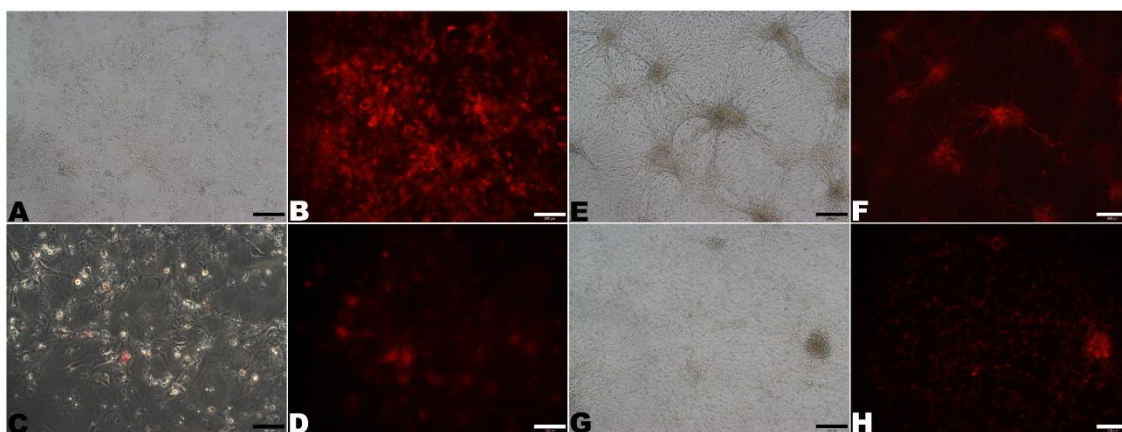
Obr. 14 Indukce diferenciace v adipocyty (pokus č. 1). Před histologickým barvením olejovou červení O: **A)** diferenciální médium s mLIF, **C)** diferenciální médium bez mLIF **E)** diferenciální médium s mLIF **G)** diferenciální médium bez mLIF, **I)** DMEM s mLIF, **K)** DMEM bez mLIF, **M)** DMEM s mLIF, **O)** DMEM bez mLIF. Po histologickém barvení olejovou červení O: **B)** diferenciální médium s mLIF, **D)** diferenciální médium bez mLIF **F)** diferenciální médium s mLIF **H)** diferenciální médium bez mLIF, **J)** DMEM s mLIF, **L)** DMEM bez mLIF, **N)** DMEM s mLIF, **P)** DMEM bez mLIF. Měřítka reprezentují 200 μm .



Obr. 15 Indukce diferenciace v adipocyty u XtTSCc (pokus č. 2). Před histologickým barvením olejovou červení O: **A)** diferenciální médium s mLIF, **E)** kondicionované médium s mLIF **I)** DMEM s mLIF (negativní kontrola). Po histologickém barvení olejovou červení O: **B, C, D)** diferenciální médium s mLIF, **F, G, H)** kondicionované médium s mLIF **J)** DMEM s mLIF (negativní kontrola). Měřítka reprezentují 100 μ m.

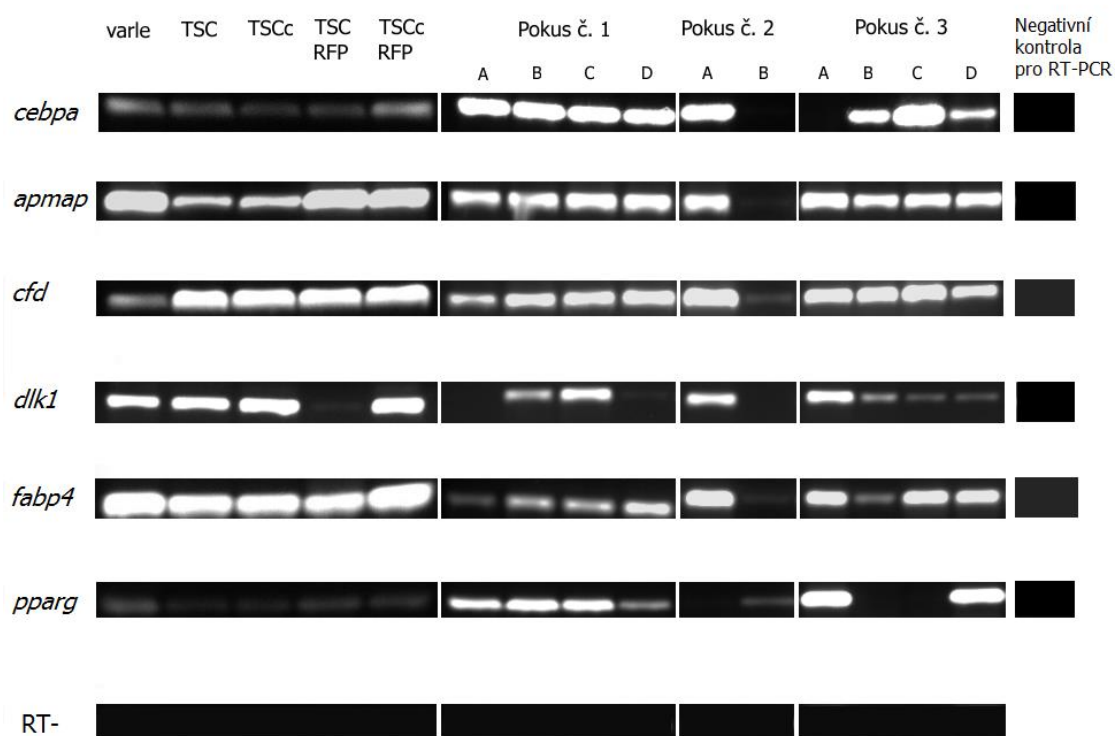


Obr. 16 Indukce diferenciace v adipocyty u XtTSCc (pokus č. 3). Před histologickým barvením olejovou červení O: **A)** kondiciované médium bez mLIF, **C)** DMEM bez mLIF (negativní kontrola). Po histologickém barvení olejovou červení O: **B)** kondiciované médium bez mLIF **D)** DMEM bez mLIF (negativní kontrola). Měřítka reprezentují 200 μm (**A**, **C**) a 100 μm (**B**, **D**).



Obr. 17 Indukce diferenciace v adipocyty *in vitro* u XtTSCc-RFP (pokus č. 3). Před histologickým barvením olejovou červení O: **A)** kondiciované médium bez mLIF, **E)** DMEM bez mLIF (negativní kontrola). Po histologickém barvení olejovou červení O: **C)** kondiciované médium bez mLIF **G)** DMEM bez mLIF (negativní kontrola). Na obrázcích **B**, **D**, **F**, **H** je ukázán RFP signál XtTSCc-RFP. Měřítka reprezentují 200 μm (**A**, **B**, **E**, **F**, **G**, **H**) a 100 μm (**C**, **D**).

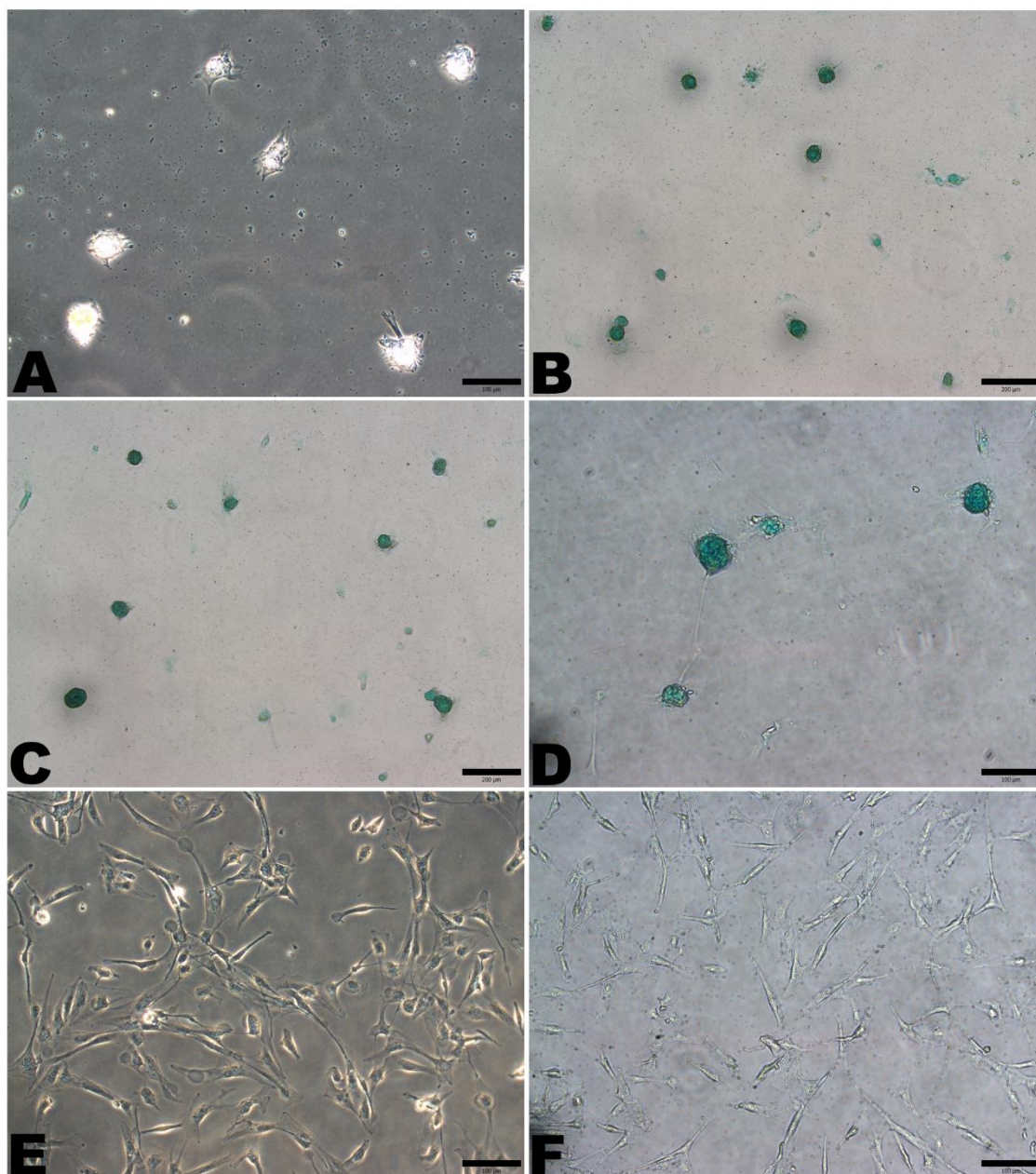
V pokusu č. 2 buňky vykazovaly vysokou úmrtnost (Obr. 15) a z toho důvodu se nepodařilo izolovat dostatečné množství RNA z XtTSCc pod vlivem diferenciačního média bez mLIF. Koncentrace izolované RNA z XtTSCc pod vlivem kondiciovaného média bez mLIF byla také velmi nízká, proto při analýze exprese genů typických pro adipocyty na úrovni RNA není výsledek pokusu č. 2 relevantní. Většina uvedených genů je exprimována ve varleti a kulturách buněk již před indukcí diferenciace. Zajímavým výsledkem je pozitivní exprese genu *cebpa* v pokusu č. 1 ve srovnání s expresí ve varlatech a kulturách buněk před diferenciací. Tento gen vykazuje také vyšší expresi v pokusu č. 3 u XtTSCc po diferenciaci ve srovnání s negativními kontrolami XtTSCc a XtTSCc-RFP. Dále stojí za zmínku gen *ppary* (*pparg*), který vykazuje vyšší expresi v pokusu č. 1 než ve varleti a kulturách buněk před diferenciací a jako jediný gen v pokusu č. 2 ukazuje vyšší expresi u buněk kultivovaných v kondiciovaném médiu s mLIF než u negativní kontroly. V pokusu č. 3 je *ppary* také exprimován u XtTSCc-RFP po diferenciaci na rozdíl od negativní kontroly. Na druhou stranu je v pokusu č. 3 jeho exprese vyšší u negativní kontroly XtTSCc než v izolované RNA z XtTSCc po diferenciaci (Obr. 18).



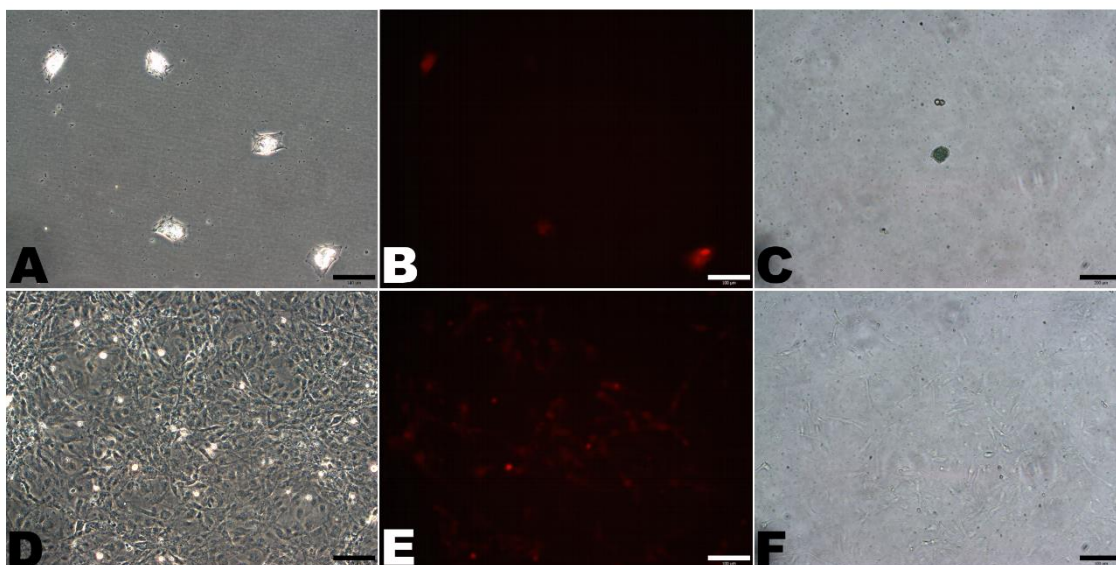
Obr. 18 Analýza genů typických pro adipocyty na úrovni RNA. V pokusu č. 1 byla RNA izolována z EBs z XtTSCc-RFP pod vlivem diferenciačního média s mLIF (A) a bez mLIF (B) a z XtTSCc-RFP v monolayeru pod vlivem diferenciačního média s mLIF (C) a bez mLIF (D). V pokusu č. 2 byla RNA izolována z negativní kontroly XtTSCc (A) a XtTSCc pod vlivem kondiciovaného média s mLIF (B). V pokusu č. 3 byla RNA izolována z negativních kontrol XtTSCc (A) a XtTSCc-RFP (B) a z XtTSCc (C) a XtTSCc-RFP (D) pod vlivem kondiciovaného média bez mLIF. RT- reprezentuje negativní kontrolu reverzní transkripce. Negativní kontrola pro RT-PCR představuje reakce připravené bez templátu.

7.5.3 Diferenciace v chondroblasty

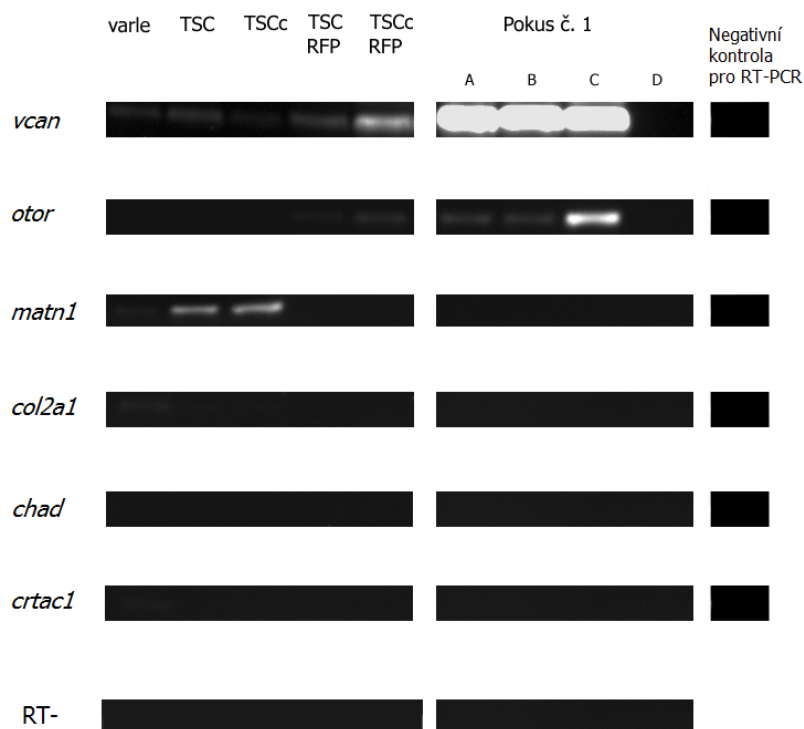
Během indukce diferenciace v chondroblasty pomocí diferenciačního média ze StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit buňky značně odumíraly. Z toho důvodu byly oba pokusy ukončeny dříve, než bylo původně dle instrukcí výrobce plánováno (12 dní). Nicméně ve všech případech tato diferenciace ukázala nejmarkantnější morfologickou změnu buněk. Buňky se shlukovaly do kruhovitých útvarů připomínající izogenetické skupiny chondrocytů v hyalinní chrupavce. V rámci pokusu č. 1 byla na základě barvení alcianovou modří (Obr. 19) a exprese genů *vcn* a *otor* (Obr. 21) prokazatelně úspěšnější diferenciace u XtTSCc oproti linii XtTSCc-RFP (Obr. 20).



Obr. 19 Indukce diferenciace v chondroblasty u XtTSCc (pokus č. 1). Před histologickým barvením alciánovou modří: **A)** kondiciované médium bez mLIF, **E)** DMEM bez mLIF (negativní kontrola). Po histologickém barvení alciánovou modří: **B, C, D)** kondiciované médium bez mLIF **F)** DMEM bez mLIF (negativní kontrola). Měřítka reprezentují 200 μm (**B, C**) a 100 μm (**A, D, E, F**).

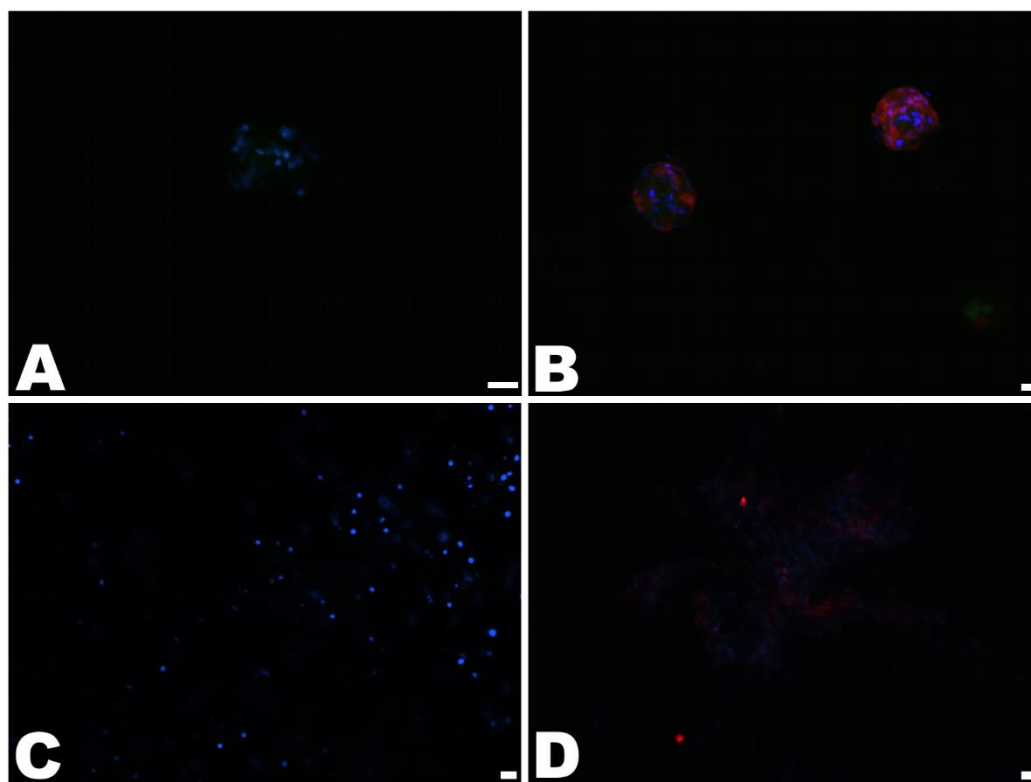


Obr. 20 Indukce diferenciace v chondroblasty u XtTSCc-RFP (pokus č. 1). Před histologickým barvením alciánovou modří: **A)** kondiciované médium bez mLIF, **D)** DMEM bez mLIF (negativní kontrola). Po histologickém barvení alciánovou modří: **C)** kondiciované médium bez mLIF **G)** DMEM médium mLIF (negativní kontrola). Na obrázcích **B, E** je ukázán RFP signál XtTSCc-RFP. Měřítka reprezentují 200 μ m (**C**) a 100 μ m (**A, B, D, E, F**).



Obr. 21 RT-PCR analýza genů typických pro chondroblasty. V pokusu č. 1 byla RNA izolována z negativních kontrol XtTSCc (**A**) a XtTSCcRFP (**B**) kultivovaných v DMEM bez mLIF a ze vzorků XtTSCc (**C**) a XtTSCc-RFP (**D**) kultivovaných pod vlivem diferenciačního kondiciovaného média bez mLIF. RT- reprezentuje negativní kontrolu reverzní transkripce. Negativní kontrola pro RT-PCR představuje reakce připravené bez templátu.

V pokusu č. 2 bylo provedeno imunocytochemické barvení protilátkou proti kolagenu typu II, což je protein typický pro mezibuněčnou hmotu chondrocytů. I když byla viditelná typická morfologie buněk jako při histologickém barvení, fluorescenční signál nebyl znatelný (Obr. 22). Kolagen typu II (*col2a1*) nebyl prokázán v buňkách ani na úrovni RNA (Obr. 21).

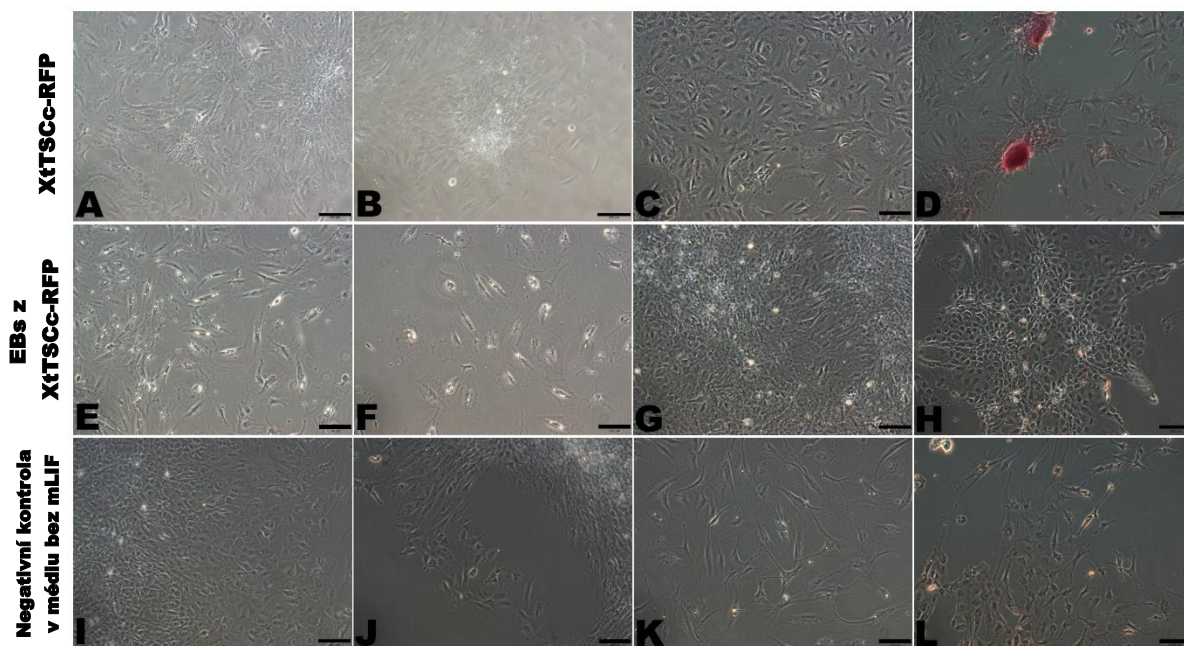


Obr. 22 Imunofluorescenční analýza exprese proteinu kolagenu typu II specifického pro chondroblasty (zeleně): A) XtTSCc, B) XtTSCc-RFP, C) negativní kontrola XtTSCc, D) negativní kontrola XtTSCc-RFP. Jádra jsou barvena DAPI (modře). Měřítka reprezentují 50 μ m.

7.5.4 Diferenciace v osteoblasty

Při řízené diferenciaci *in vitro* v osteoblasty bylo v pokusu č. 1 vyzkoušeno diferenciální médium doplněné o kyselinu askorbovou, dexametazon a β -glycerofosfát. Pod vlivem tohoto média bez mLIF došlo k diferenciaci XtTSCc-RFP, což bylo potvrzeno histologickým barvením alizarinovou červení (Obr. 23D). Na úrovni transkripce byly geny *colla1*, *fn1* a *runx2* exprimovány více než ve varletech a kulturách

buněk před diferenciací, nicméně rozdíly v expresi mezi jednotlivými RNA izolovanými v rámci pokusu č. 1 nejsou příliš patrné (Obr. 27). Nižší exprese je zřejmá u XtTSCc-RFP pod vlivem diferenciačního média s mLIF u genu *dcn* než u ostatních RNA a stejně tak exprese genu *fn1* u EBs vytvořených z XtTSCc-RFP pod vlivem diferenciačního média bez mLIF (Obr. 27).

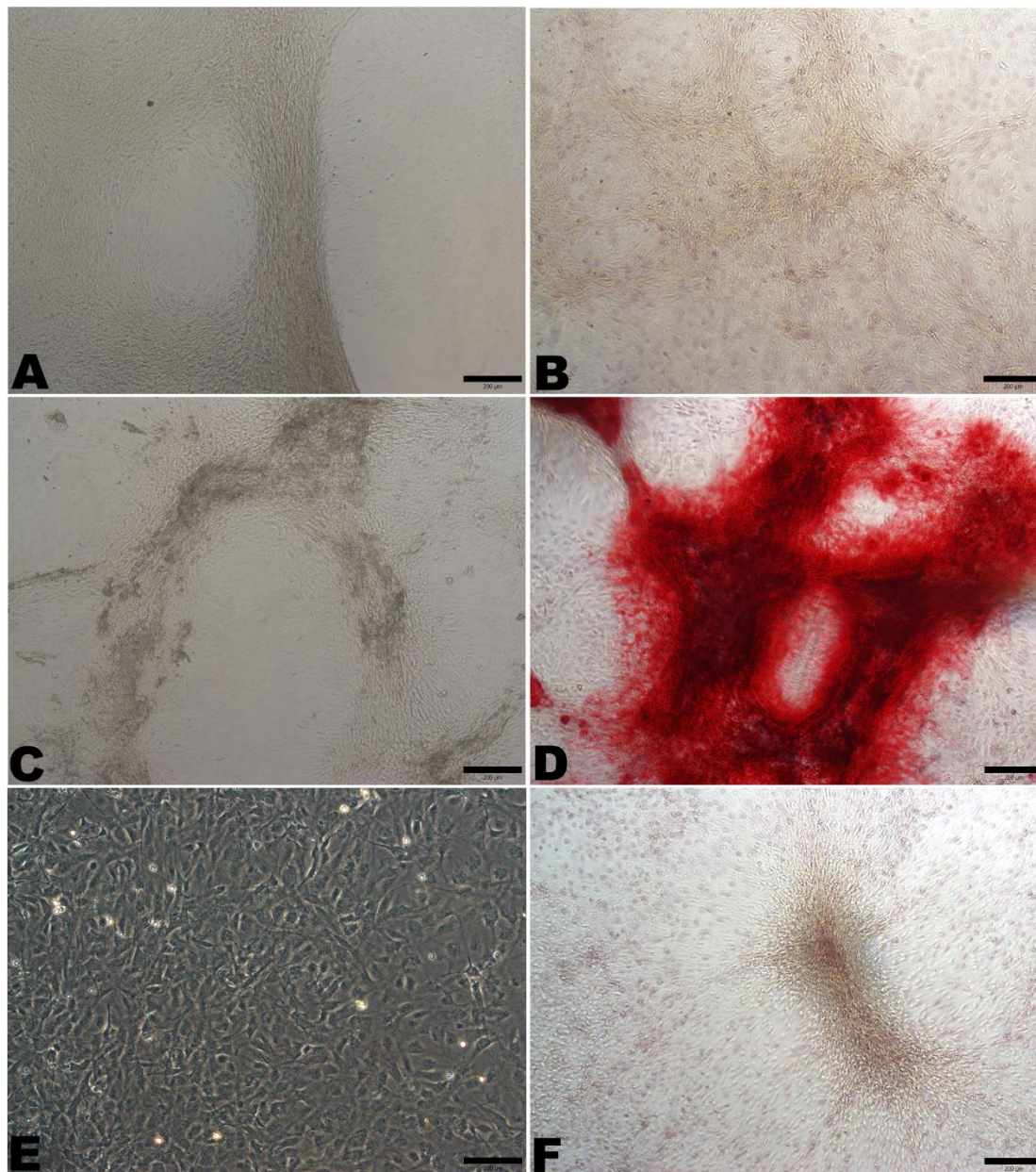


Obr. 23 Indukce diferenciaci v osteoblasty (pokus č. 1). Před histologickým barvením alizarinovou červení: **A)** DMADG s mLIF, **C)** DMADG bez mLIF **E)** DMADG s mLIF **G)** DMADG bez mLIF, **I)** XtTSCc-RFP, **K)** EBs z XtTSCc-RFP. Po histologickém barvení: **B)** DMADG s mLIF, **D)** DMADG bez mLIF **F)** DMADG s mLIF **H)** DMADG bez mLIF, **J)** XtTSCc-RFP, **L)** EBs z XtTSCc-RFP. Negativní kontroly XtTSCc-RFP a EBs XtTSCc-RFP v médiu s mLIF před a po barvení nejsou ukázány. Měřítka reprezentují 100 μ m.

V následujících pokusech bylo již vyzkoušeno diferenciační médium ze StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit. Toto médium jak s mLIF či bez mLIF ukázalo výraznější diferenciaci v osteoblasty a to na základě histologického barvení alizarinovou červení. Při barvení byly znatelné vizuální rozdíly mezi diferencovanými buňkami a negativní kontrolou. Buňky negativní kontroly se během procesu barvení a následného promývání zvedaly ze dna destiček ve větších klastrech, naopak diferencované buňky byly pevně přisedlé. Mimo pevné adheze navíc vykazovaly výrazné červené zbarvení kalciových depozit viditelné pouhým okem.

V pokusu č. 2 byla potvrzena diferenciaci XtTSCc pod vlivem kondiciovaného média s mLIF ze StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit a to jak na základě

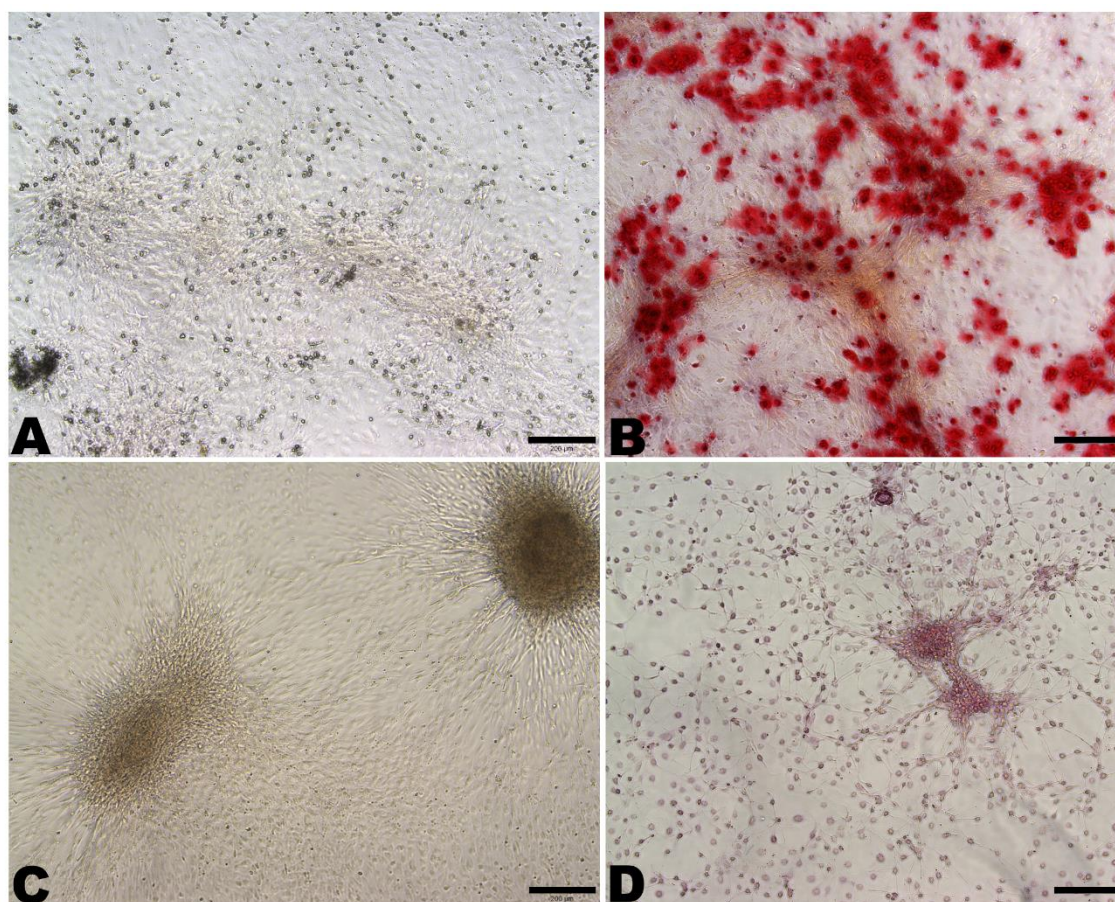
histologického barvení (Obr. 24), tak i na základě analýzy specifických genů na úrovni RNA, kde v případě genů *colla1*, *dcn* i *fn1* byla exprese vyšší než ve zbývajících dvou vzorcích RNA (Obr. 27).



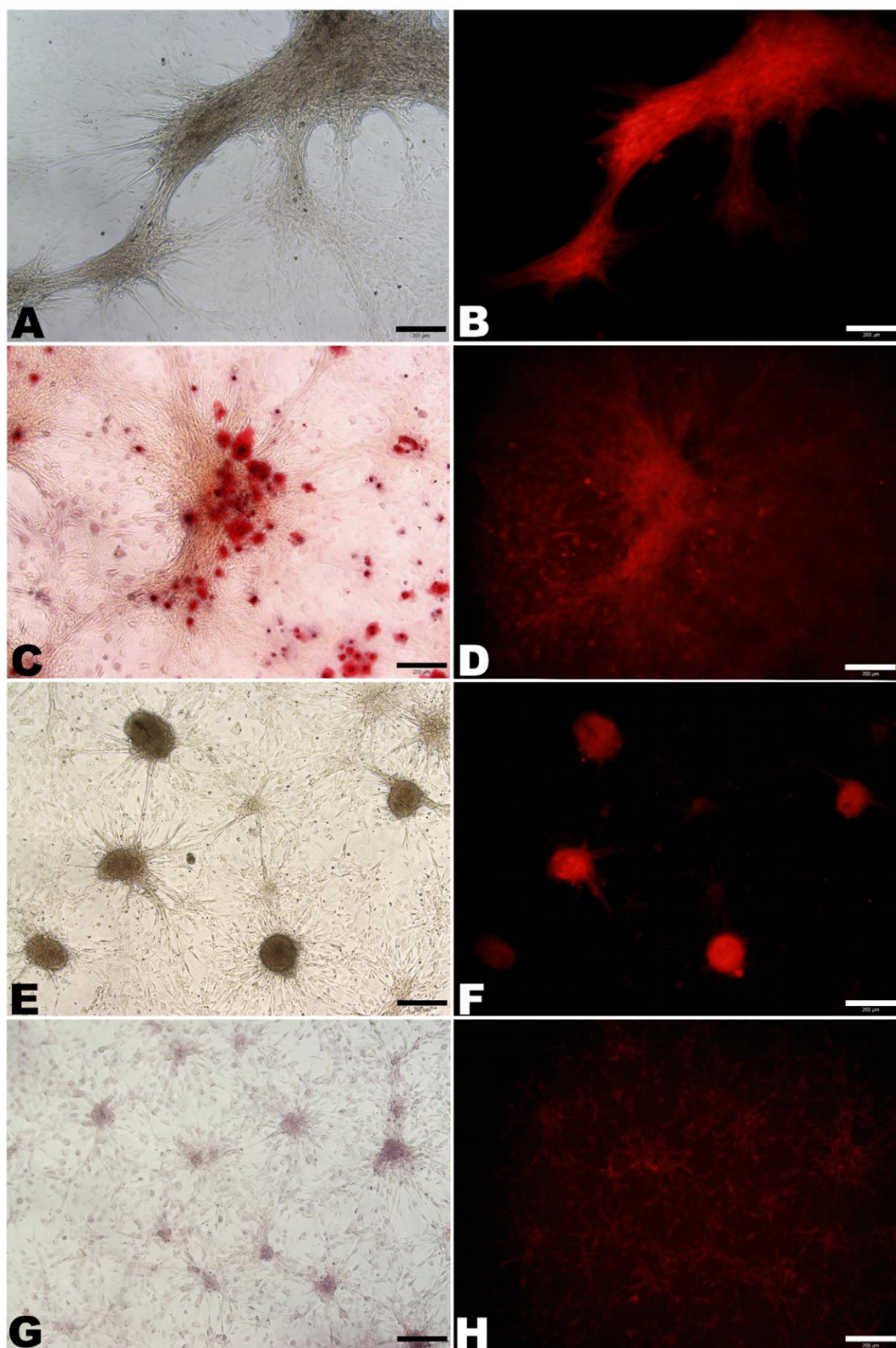
Obr. 24 Indukce diferenciace v osteoblasty XfTSCc (pokus č. 2). Před histologickým barvením: **A)** diferenciační médium s mLIF, **C)** kondiciované médium s mLIF **E)** DMEM s mLIF (negativní kontrola). Po histologickém barvení: **B)** diferenciační médium s mLIF, **D)** kondiciované médium s mLIF **F)** DMEM s mLIF (negativní kontrola). Měřítka reprezentují 200 μm (**A, B, C, D, F**) a 100 μm (**E**).

Během pokusu č. 3 byly XfTSCc a XfTSCc-RFP kultivovány pouze v kondiciovaném médiu ze StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit bez přítomnosti

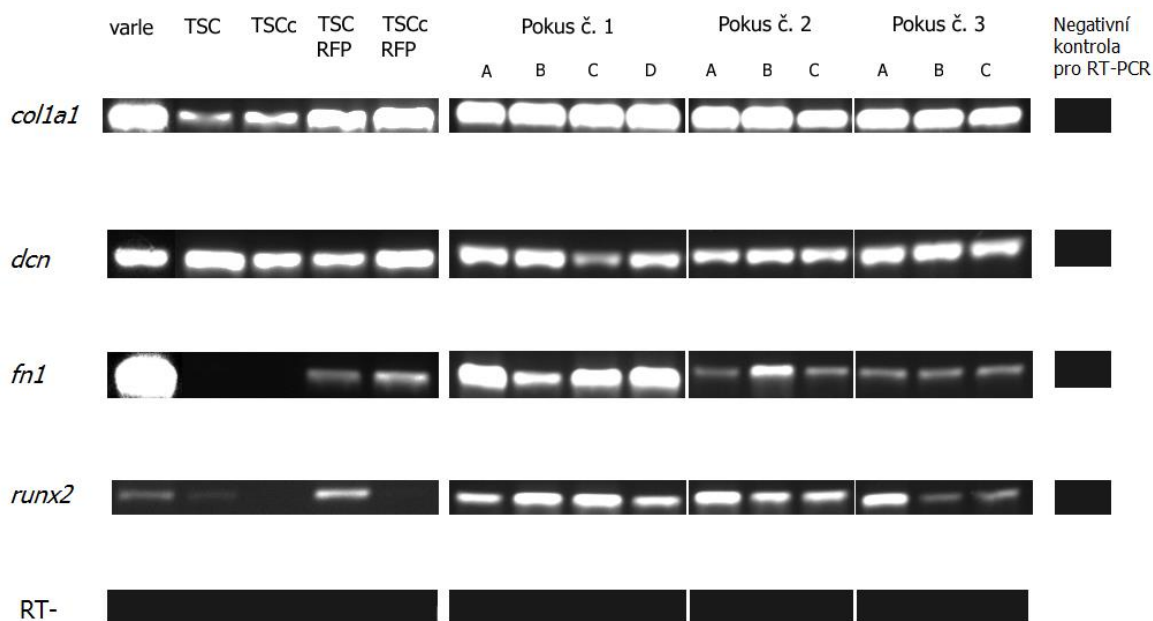
mLIF. Při porovnání výsledku histologického barvení alizarinovou červení u obou typů buněk byla úspěšnější diferenciace u XtTSCc (Obr. 25). Přesto i v případě diferenciace XtTSCc-RFP bylo znatelné pozitivní zbarvení vápníkových depozit (Obr. 26). Vzhledem k tomu, že došlo během pokusu ke kontaminaci plísní u vzorku XtTSCc po diferenciaci určeného na izolaci RNA, není uvedené srovnání mezi touto RNA s RNA izolovanou z XtTSCc-RFP po diferenciaci. Nicméně v případě genu *colla1* a *runx2* se zdá být exprese u XtTSCc-RFP po diferenciaci vyšší než u negativních kontrol.



Obr. 25 Indukce diferenciace XtTSCc v osteoblasty (pokus č. 3). Před histologickým barvením: **A)** kondiciované médium bez mLIF, **C)** DMEM bez mLIF (negativní kontrola). Po barvení alizarinovou červení: **B)** kondiciované médium bez mLIF **D)** DMEM bez mLIF (negativní kontrola). Měřítka reprezentují 200 μm.



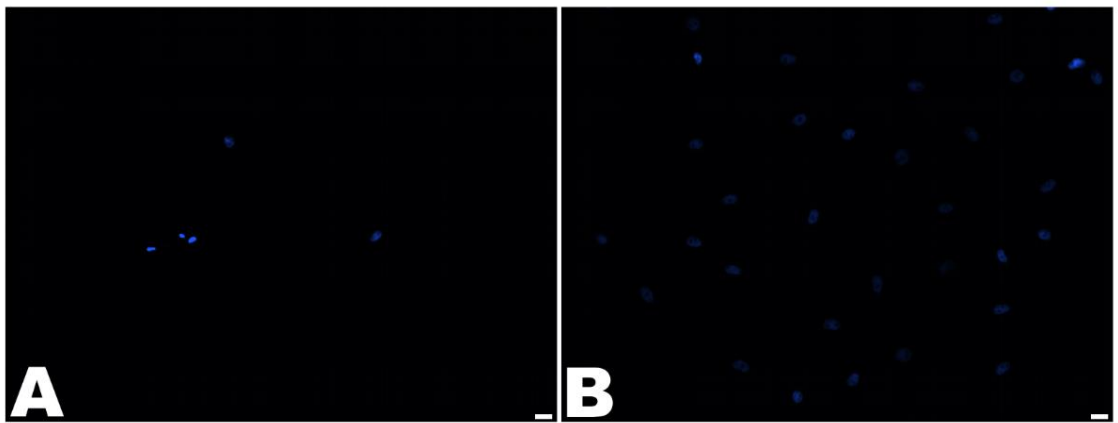
Obr. 26 Indukce diferenciace XtTSCc-RFP v osteoblasty (pokus č. 3). Před histologickým barvením: **A)** kondiciované médium bez mLIF, **E)** DMEM bez mLIF (negativní kontrola). Po barvení: **C)** kondiciované médium bez mLIF **G)** DMEM bez mLIF (negativní kontrola). Na obrázcích **B, D, F, H** je ukázán RFP signál XtTSCc-RFP. Měřítka reprezentují 200 μm .



Obr. 27 RT-PCR analýza genů typických pro osteoblasty. V pokusu č. 1 byla RNA izolována z EBs vytvořených z XtTSCc-RFP v DMADG s mLIF (A) a v DMADG bez mLIF (B) a dále z XtTSCc-RFP rostoucích v monolayeru v DMADG s mLIF (C) a v DMADG bez mLIF (D). V pokusu č. 2 byla RNA izolována z XtTSCc kultivovaných v diferenciačním médiu s mLIF (A), v kondiciovaném médiu s mLIF (B) a v DMEM s mLIF (negativní kontrola) (C). V pokusu č. 3 byla RNA izolována z XtTSCc-RFP v kondiciovaném médiu bez mLIF (A) a z negativních kontrol XtTSCc (B) a XtTSCc-RFP (C) kultivovaných v DMEM bez mLIF. RT- reprezentuje negativní kontrolu reverzní transkripce. Negativní kontrola pro RT-PCR představuje reakce připravené bez templátu.

7.5.5 Diferenciace v neuroektoderm

Přítomnost kyseliny retinové v kultivačním médiu nepodpořila diferenciaci směrem k neurální linii. XtTSCc i XtTSCc-RFP v DMRA odumíraly a z důvodu nízkého počtu buněk se nepodařilo izolovat RNA. Specifické protilátky zn12 (Obr. 28) a NAA nevykazovaly žádný pozitivní signál.



Obr. 28 Indukce diferenciace *in vitro* v neuroektoderm. Imunofluorescenční analýza exprese zn12 specifického pro povrch buněk neurální linie (zeleně): **A)** EBs z XtTSCc, **B)** EBs z XtTSCc-RFP. Jádra jsou barvena DAPI (modře). Měřítka reprezentují 50 µm.

8 Diskuze

Testikulární buněčná kultura *X. tropicalis*, založená v Laboratoři vývojové biologie PřF UK, je složená z adherentní podpůrné vrstvy podobné Sertoliho buňkám (XtTSC) a z kolonií buněk podobným ESCs (XtTSCc), které se formují při dlouhodobé kultivaci.

Vůbec první popsanou dlouhodobou kulturou kmenových buněk odvozených z varlat byla kultivace myších GSCs, které v přítomnosti růstových faktorů EGF, FGF2 (bFGF), GDNF a LIF tvořily kolonie, ale častým pasážováním ztrácely podobnost s ESCs (Kanatsu-Shinohara et al. 2003). Z toho důvodu bylo vyzkoušeno standardní kultivační médium pro ESCs s přidavkem 15% FBS a LIF, což v raných fázích kultivace způsobilo konverzi GSCs na mGSCs s multipotentním charakterem (Kanatsu-Shinohara et al. 2004). LIF je známým cytokinem podporujícím proliferaci, tvorbu kolonií a dlouhodobé přežívání kmenových buněk a ve varleti jsou jeho hlavním zdrojem PTMCs umístěné na periferii semenotvorných kanálků (Piquet-Pellorce et al. 2000). Exprese LIF však byla nalezena i u SCs, LCs a spermatogonií (Jenab and Morris 1998).

Pomocí RT-PCR analýzy byla odhalena poměrně vysoká transkripce *lif* i u XtTSC a XtTSCc, což může být možným odůvodněním, proč se při dlouhodobé kultivaci XtTSC postupně formují kolonie podobné ESCs (XtTSCc). Růstová křivka poté ukázala, že pokud je při dlouhodobé kultivaci XtTSC přidán myší leukemický inhibiční faktor (mLIF) do média, je tvorba kolonií značně urychlena. Z průběhu křivky je také patrné, že obohacení kultivačního média o mLIF není zapotřebí pro proliferaci a přežívání XtTSC v kultuře, jako je tomu např. v případě kultivace PGCs *in vitro* (Matsui et al. 1992; Resnick et al. 1992). Na rozdíl od testikulárních kultur odhalila RT-PCR nízkou expresi *lif* ve varleti dospělého samce *X. tropicalis*. Je tedy možné, že u *X. tropicalis* je *lif* produkován ojedinelou populací buněk, které když se dostanou z původní niky varlat a jsou kultivovány *in vitro*, začnou produkovat vyšší množství Lif (Tlapakova et al. 2016).

Původ testikulární buněčné kultury byl poodhalen detailní analýzou genů exprimovaných u XtTSC, XtTSCc a transgenní linie exprimující červený fluorescenční protein Katushka RFP (XtTSC-RFP a XtTSCc-RFP) připravené v Laboratoři vývojové biologie PřF UK. Během zakládání primárních kultur z varlat u různých modelových organismů dochází často k izolaci spermatogoniálních kmenových buněk (Kanatsu-

Shinohara et al. 2003; Guan et al. 2006; Conrad et al. 2008; Kossack et al. 2009). V našem případě geny specifické pro zárodečnou linii (*dazl*, *ddx4* a *ddx25*) nebyly opakovaně v buňkách detekovány, což naznačuje jejich somatický původ. Z toho důvodu byla provedena analýza genů typických pro somatické buňky varlat. Ta odhalila přítomnost transkriptů genů PTMCs (*lif* a *acta2*) a SCs (*sox9* a *vimentin*). Na druhou stranu ale nebyla potvrzena exprese genů typických pro LCs (*cyp11a1* a *cyp17a1*). Mimo to byla exprese Sox9, Sma a Vimentinu ještě potvrzena i imunofluorescenčním barvením, kde byla pozorována kolokalizace na více než 80 % buněk. Na úrovni transkripce, XtTSC a XtTSCc exprimovaly i některé geny pluripotence (*klf4* a *myc*). Expresi těchto genů byla nalezena i u primární kultury testikulárních buněk získaných od pacientů s rakovinou prostaty. Tyto buňky pak byly pojmenovány jako buňky podobné ESCs odvozené z varlat (htES-like buňky - human testis-derived ES-like cells) a taktéž u nich docházelo k expresi genů *KLF4* a *MYC*, ale ne *SOX2*, *NANOG* a *POU5F1* (Chikhovskaya et al. 2012).

Na základě výsledků genové exprese vyvstala otázka, jaký mají XtTSC, popř. XtTSCc diferenciační potenciál. Pro prokázání pluripotentního charakteru XtTSC, popř. XtTSCc, byla zvolena metoda „Hanging drop“ navržená za účelem spontánní diferenciace ESCs. Tato metoda spočívá ve vytvoření trojrozměrných shluků buněk v zavěšené kapce média bez LIF pojmenovaných jako embryoidní tělíska (EBs), u kterých dochází během navazující kultivace ke spontánní diferenciaci do derivátů všech tří zárodečných listů. V jednom z publikovaných protokolů je uvedeno, že k vytvoření EBs z myších ESCs je zapotřebí 400-500 buněk (Wang and Yang 2008). Při standardizaci metody „Hanging drop“ u XtTSCc, popř. XtTSCc-RFP však nebylo možné vytvořit EBs z tak nízkého počtu buněk. Z toho důvodu byl stanoven minimální počet na 3000 buněk. Nicméně v řadě následujících pokusů o spontánní či indukovanou diferenciaci byla EBs tvořena i z počtu 6000 XtTSCc, popř. XtTSCc-RFP, protože právě populace XtTSCc-RFP nevytvářela při nižším počtu buněk tak souměrná EBs jako v případě XtTSCc. I když byly XtTSCc, popř. XtTSCc-RFP schopny formovat EBs, nebyla na základě metody RT-PCR ani imunofluorescenčního barvení prokázána spontánní diferenciace.

Tento výsledek byl zaznamenán i ve studii popisující již výše zmíněné htES-like buňky, jimž se podobají XtTSC expresí genů pluripotentních buněk (Chikhovskaya et al. 2012). U htES-like buněk byl mimo jiné popsán i podobný expresní profil, který je typický pro mezenchymální kmenové buňky (přítomnost *CD73*, *CD90* a *CD150* a

absence *CD31*, *CD34* a *CD45*), což bylo podpořeno i úspěšnou diferenciací v adipocyty, chondrocyty a osteocyty *in vitro*. Přítomnost transkriptů zmíněných genů a schopnost diferencovat v tyto typy buněk naznačuje multipotentní charakter této linie. To vedlo k myšlence provést RT-PCR genů typických pro MSCs i u XtTSC a XtTSCc. Výsledkem bylo, že byla nalezena transkripce některých genů MSCs (*cd29 (itgb1)*, *cd44* a *cd90 (thy1)*). Vzhledem k tomu, že je vimentin protein typický nejen pro SCs, ale i pro intermediární filamenta MSCs, jsou XtTSC pravděpodobně společným progenitorem PTMCs a SCs vykazující vlastnosti mezenchymálních buněk (Tlapakova et al. 2016).

Je známo, že indukce diferenciace *in vitro* je u MSCs možná nejen do mezodermálních adipocytů, chondrocytů a osteocytů, ale i do buněk neuroektodermu či endodermu. Většina studií však popisuje indukci diferenciace u MSCs izolovaných především z kostní dřeně (Woodbury et al. 2000; Bertani et al. 2005; Wislet-Gendebien et al. 2005; Santos et al. 2010). V roce 2012 byla publikována studie popisující populaci domnělých kmenových buněk, které byly získány při biopsii varlat u pacientů se syndromem SCO (Stimpfel et al. 2012). Tyto testikulární kmenové buňky exprimovaly jak některé geny pluripotence (*OCT4A*, *NANOG*, *SOX2*), tak gen *CD105*, jehož přítomnost naznačuje možný charakter MSCs. Při dlouhodobé kultivaci buňky spontánně diferencovaly jak do buněk neurálního charakteru barvitelných na nestin, tak i adipocytů barvitelných olejovou červení. V případě, že byly tyto testikulární kmenové buňky kultivovány v médiu pro diferenciaci v pankreatické buňky (médiu nebylo uvedeno), došlo ke změně jejich morfologie a imunofluorescenční barvení prokázalo pozitivní signál inzulinu (Stimpfel et al. 2012). Tato populace testikulárních kmenových buněk se zdá být srovnatelná s již dříve popsány kmenovými buňkami gonád (Gonzalez et al. 2009). Zásadním rozdílem však bylo, že kmenové buňky gonád, a to i přes expresi některých genů pluripotence, nevykazovaly pluripotentní charakter v rámci diferenciace *in vitro*, ale dokázaly při použití komerčních diferenciačních médií diferencovat pouze do adipocytů, chondrocytů a osteocytů.

V našem případě se XtTSC, popř. XtTSCc podobají spíše kmenovým buňkám gonád, jelikož se prozatím nepodařilo indukovat diferenciaci do buněk neuroektodermu a kardiomyocytů. Při řízené diferenciaci do kardiomyocytů byly použity různé koncentrace kyseliny askorbové (10^{-2} – 10^{-5} mol/l) běžně používané pro diferenciaci ESCs (Takahashi et al. 2003), ale ani u jedné z nich se imunofluorescenčním barvením nepodařilo prokázat

změnu fenotypu v srdeční buňky. Testované geny, které jsou typické pro kardiomyocyty (např. *gata4*, *nkx2.5*), byly exprimovány jak před, tak po indukci diferenciaci. Možným vysvětlením, proč dochází k expresi genu *gata4* u XtTSCc již před diferenciací, je objevení tohoto genu i u nematurovaných SCs (Yagi et al. 2007), což by podporovalo tvrzení, že XtTSC jsou společným progenitorem PTMCs a SCs (Tlapakova et al. 2016).

Kyselina retinová (RA) je známý induktor diferenciaci do buněk neurálního charakteru (Moghadasali et al. 2007; Moraveji et al. 2012). V případě jejího využití při indukci diferenciaci XtTSCc, popř. XtTSCc-RFP však nebyl její účinek prokázán. Buňky zastavily proliferaci a v médiu s přidavkem RA postupně odumíraly. Vysvětlením může být výzkum provedený u ESCs, který ukázal, že právě přidání RA do média nebo naopak odebrání 2-merkaptetanolu spouští apoptózu. Stejná studie přišla i s řešením, jak přizpůsobit médium pro neurální indukci diferenciaci u ESCs. Dospěli k závěru, že médium musí obsahovat RA i 2-merkaptetanol, ale musí být vynecháno sérum, které podporuje proliferaci na úkor diferenciaci (Castro-Obrégon and Covarrubias 1996). Takové složení média by mohlo být v budoucnu otestováno i u kultury XtTSCc, popř. XtTSCc-RFP.

Prozatím nebyla vyzkoušena řízená diferenciaci do buněk endodermu a není tak možné vyloučit, že by XtTSC měly pluripotentní charakter. Nicméně výsledky provedených pokusů naznačují, že XtTSCc a XtTSCc-RFP diferencují pouze do buněk mezenchymální řady, s čímž korelují i již výše zmíněné studie provedené na lidských buňkách odvozených z varlat a vykazují tak vlastnosti podobné multipotentním MSCs (Gonzalez et al. 2009; Chikhovskaya et al. 2012).

Ve všech třech případech indukce diferenciaci byly použity sady médií a doplňků navržené pro MSCs patentované firmou Life Technologies. Značnou nevýhodou je, že není známo jejich přesné složení. Na druhou stranu umožnily v našem případě otestovat, zda XtTSC vykazují mezenchymální charakter, jelikož příprava vlastního diferenciačního média nemusí být vždy finančně dostupná. Ve většině pokusů byly XtTSCc, popř. XtTSCc-RFP kultivovány v kondiciovaném médiu, do kterého buňky v průběhu kultivace produkují vlastní bioaktivní látky, např. růstové faktory a cytokiny (Bollini et al. 2013). V případě *in vitro* diferenciaci XtTSCc, popř. XtTSCc-RFP v adipocyty a osteoblasty prokázala kultivace v kondiciovaném médiu bez přidavku mLIF účinnější diferenciaci v dané buňky než při kultivaci v nekondiciovaném diferenciačním médiu. Vzhledem k

předčasnému ukončení indukce diferenciaci v chondroblasty, není v tomto případě podobné srovnání relevantní. Dosažený výsledek podporuje i fakt, že MSCs jsou známy svou sekrecí bioaktivních faktorů, které potlačují lokální imunitní systém, inhibují apoptózu a naopak stimulují mitózu a podporují diferenciaci (A. I. Caplan and Dennis 2006).

Při indukci diferenciaci XtTSCc a XtTSCc-RFP v adipocyty byla změna prokázána barvením lipidových váček olejovou červení. Lipidové váčky byly pozorovány za všech podmínek diferenciaci, i když ne v takovém počtu jako v jiných již zveřejněných studiích (Gonzalez et al. 2009; Chikhovskaya et al. 2012). Transkripty testovaných genů byly přítomny ve varlatech *X. tropicalis* a buněčných kulturách již před diferenciací, za zmínku však stojí vyšší exprese genů *cebpa* a *ppary* po indukci diferenciaci. Mezi těmito geny totiž existuje pozitivní zpětná vazba, jelikož *ppary* aktivuje expresi *cebpa* a *cebpa* je nezbytná k aktivaci exprese *ppary* v diferencovaných adipocytech (Wu et al. 1999).

Diferenciaci XtTSCc a XtTSCc-RFP v chondroblasty byla prokázána histologickým barvením proteoglykanů a glukoasminoglykanů alcianovou modří. Imunofluorescenční barvení kolagenu typu II ale nebylo signifikantní. V průběhu pokusu docházelo ke značnému odumírání buněk, ale i přesto byla u XtTSCc a v menší míře i XtTSCc-RFP viditelná změna morfologie. Buňky připomínaly izogenetické skupiny chondrocytů, které se normálně tvoří v hyalinní chrupavce. Je možné, že absence těsného kontaktu mezi jednotlivými skupinkami buněk nezajistil vhodné prostředí a nedošlo tak k produkci mezibuněčné hmoty, jejíž hlavní složkou je právě kolagen typu II (Gao et al. 2014). Důvodem mohlo být nevhodné prostředí při kultivaci v monolayeru. I přesto, že byla popsána *in vitro* diferenciaci v chondrocyty během kultivace jedné vrstvy buněk (Lin et al. 2005), rozšířenějším způsobem je kultivace kmenových buněk v peletě, kde jsou tak zajištěny mezibuněčné interakce důležité při vývoji chrupavky (Johnstone et al. 1998; Bosnakovski et al. 2004; Diekman et al. 2010). Po indukci diferenciaci byla pomocí RT-PCR odhalena u XtTSCc vyšší exprese genů *vcn* a *otor*. Zvláštní je, že na rozdíl od buněk mimo pokus, byla pozitivní exprese genu *vcn* pozorována i u negativních kontrol XtTSCc a XtTSCc-RFP v rámci pokusu o diferenciaci. Proč je transkript tohoto genu přítomen více u buněk v pokusu než ve varlatech a kulturách *X. tropicalis* před pokusem o diferenciaci, není zatím jasné. Je možné, že dlouhodobou kultivací či naopak častým pasážírováním, dochází ke změnám exprese různých genů u populace právě kultivovaných

buněk. V budoucnu bude proto nutné provést Real-time PCR testovaných genů pro každou šarži právě zkoumaných XtTSCc či XtTSCc-RFP.

Fakt, že XtTSCc, popř. XtTSCc-RFP splňují jedno z kritérií charakterizace MSCc (Dominici et al. 2006), prokázala i indukce diferenciaci směrem k osteoblastům. Vyjma patentované sady médií s doplňky, bylo použito i definované diferenciacní médium obohacené o kyselinu askorbovou, dexametazon a β -glycerofosfát (DMADG) (Song et al. 2009). Histologickým barvením vápníkových depozit alizarinovou červení bylo u XtTSCc a XtTSCc-RFP prokázáno, že oba dva typy médií jsou pro indukci osteogenní diferenciaci vhodné, ale pouze bez přídavku mLIF. LIF je totiž možným inhibitorem osteogenní diferenciaci v případě, že je přidán ke kultivovaným buňkám v pozdní osteoprogenitorové/časné osteoblastové fázi (Falconi and Aubin 2007). Ačkoliv XtTSCc diferenciovaly i v médiu s mLIF, důvodem mohlo být použití kondiciovaného média. Při srovnání s nekondiciovaným diferenciacním médiem, již zřejmě obsahovalo buňkami vyprodukované bioaktivní látky, které osteogenní diferenciaci podpořily (Lee et al. 2014).

Gen *runx2* je důležitým transkripčním faktorem pro diferenciaci do osteoblastů a při tvorbě kosti. Ukázalo se, že hraje klíčovou roli v produkci matrix a mineralizaci (Liu et al. 2001). Testování tohoto genu a genu *colla1* (kolagen typu I je hlavní složkou mezibuněčné hmoty kosti) metodou RT-PCR u XtTSCc a XtTSCc-RFP ukázalo zvýšenou expresi obou genů po indukci diferenciaci, a potvrdilo tak výsledky pozorované po histologickém barvení.

Dosažené výsledky této diplomové práce ukázaly, že XtTSC jsou nově objevenou populací mezenchymálních progenitorů somatických PTMCs a SCs ve varlatech *X. tropicalis* (Tlapakova et al. 2016), jejichž potenciálem je diferencovat do buněk mezenchymální řady, konkrétně adipocytů, chondroblastů a osteoblastů. Diferenciaci do buněk endodermy nebyla prozatím zkoumána, je však pravděpodobné, že vzhledem k neúspěšné diferenciaci XtTSCc do buněk neurektodermy a mezodermálních kardiomyocytů, nemají tyto buňky potenciál diferencovat do buněk všech tří zárodečných listů, jako je tomu v případě ESCs. Do budoucna je nicméně plánováno vyzkoušení protokolu využívajícího nikotinamid a 2-merkaptoetanol indukující diferenciaci MSCs v β -buňky pankreatu (L.-B. Chen et al. 2004). Dále je také naplánováno testování všech zmíněných genů metodou Real-time PCR pro kvantifikaci transkriptů v reálném čase.

V současné době se do oblasti zájmu laboratoře dostává i studium imunomodulačního účinku XtTSCc-RFP při xenotransplantacích, jelikož SCs i MSCs jsou považovány za imunoprivilegované buňky modulující imunitní odpověď (Kaur et al. 2015; Susumu Ikehara 2013). Pilotní pokusy prozatím ukazují, že XtTSCc-RFP snižují imunitní odpověď u myši.

9 Závěr

- Pomocí expresní analýzy genů metodou RT-PCR byl prokázán somatický původ XtTSC (XtTSCc).
- Na základě dosažených výsledků bylo odhaleno, že XtTSC (XtTSCc) jsou pravděpodobně společným progenitorem PTMCs a SCs s vlastnostmi mezenchymálních buněk.
- Bylo zjištěno, že působením rekombinantního myšího leukemického inhibičního faktoru (mLIF) dochází ke zvýšení proliferační aktivity buněk a zejména k urychlení formování kolonií XtTSCc v kultuře.
- Byla standardizována metoda „Hanging drop“ pro buňky XtTSCc (XtTSCc-RFP).
- V rámci pokusů nebyla u XtTSC (XtTSCc) a ani u transgenní linie XtTSC-RFP (XtTSCc-RFP) potvrzena spontánní diferenciaci *in vitro*.
- Bylo dokázáno, že u studované testikulární kultury *X. tropicalis* lze indukovat diferenciaci *in vitro* v buňky mezenchymální řady, konkrétně v adipocyty, chondroblasty a osteoblasty.
- Na základě dosavadních výsledků se uvažuje o mezenchymálním původu XtTSC a jejich multipotentním charakteru.
- Část z dosažených výsledků je součástí publikace zveřejněné v časopisu s recenzním řízením.

10 Seznam literatury

- Baharvand, Hossein, Mahnaz Azarnia, Kazem Parivar, and Saeid Kazemi Ashtiani. 2005. "The Effect of Extracellular Matrix on Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 38 (3): 495–503.
- Bar-Shira Maymon, Batia, Haim Yavetz, Leah Yogev, Sandra E. Kleiman, Beatriz Lifschitz-Mercer, Letizia Schreiber, Amnon Botchan, Ron Hauser, and Gedalia Paz. 2005. "Detection of Calretinin Expression in Abnormal Immature Sertoli Cells in Non-Obstructive Azoospermia." *Acta Histochemica* 107 (2): 105–112.
- Berndtson, William E, and Terry L Thompson. 1990. "Changing Relationships between Testis Size, Sertoli Cell Number and Spermatogenesis in Sprague-Dawley Rats." *Journal of Andrology* 11 (5): 429–435.
- Bertani, Nicoletta, Paolo Malatesta, Giorgia Volpi, Paolo Sonogo, and Roberto Perris. 2005. "Neurogenic Potential of Human Mesenchymal Stem Cells Revisited: Analysis by Immunostaining, Time-Lapse Video and Microarray." *Journal of Cell Science* 118 (Pt 17): 3925–3936.
- Bollini, Sveva, Chiara Gentili, Roberta Tasso, and Ranieri Cancedda. 2013. "The Regenerative Role of the Fetal and Adult Stem Cell Secretome." *J. Clin. Med. J. Clin. Med* 2 (2): 302–327.
- Bosnakovski, Darko, Morimichi Mizuno, Gonhyung Kim, Taketo Ishiguro, Masahiro Okumura, Toshihiko Iwanaga, Tsuyoshi Kadosawa, and Toru Fujinaga. 2004. "Chondrogenic Differentiation of Bovine Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Pellet Cultural System." *Experimental Hematology* 32 (5): 502–509.
- Buehr, M, S Gu, and A McLaren. 1993. "Mesonephric Contribution to Testis Differentiation in the Fetal Mouse." *Development (Cambridge, England)* 117 (1): 273–81.
- Caplan, AI. 1991. "Mesenchymal Stem Cells." *Journal of Orthopaedic Research : Official Publication of the Orthopaedic Research Society* 9 (5): 641–50.
- Caplan, Arnold I., and James E. Dennis. 2006. "Mesenchymal Stem Cells as Trophic Mediators." *Journal of Cellular Biochemistry* 98 (5): 1076–1084.
- Castro-Obrégon, S, and L Covarrubias. 1996. "Role of Retinoic Acid and Oxidative Stress in Embryonic Stem Cell Death and Neuronal Differentiation." *FEBS Letters* 381: 93–97.
- Combes, Alexander N., Dagmar Wilhelm, Tara Davidson, Elisabetta Dejana, Vincent Harley, Andrew Sinclair, and Peter Koopman. 2009. "Endothelial Cell Migration Directs Testis Cord Formation." *Developmental Biology* 326 (1): 112–120.
- Conrad, Sabine, Markus Renninger, Jörg Hennenlotter, Tina Wiesner, Lothar Just, Michael Bonin, Wilhelm Aicher, Hans-Jorg Buhring, Ulrich Mattheus, Andreas Mack, Hans-Joachim Wagner, Stephen Minger, Matthias Matzkies, Michael Reppel, Jürgen Hescheler, Karl-Dietrich Sievert, Arnulf Stenzl and Thomas Skutella. 2008. "Generation of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Testis." *Nature* 456

- (7220) (November 20): 344–9.
- Cool, J, FD Carmona, JC Szucsik, and B Capel. 2008. “Peritubular Myoid Cells Are Not the Migrating Population Required for Testis Cord Formation in the XY Gonad.” *Sex Dev.* 2 (3): 128–133.
- D’Amour, Kevin a, Alan D Agulnick, Susan Eliazer, Olivia G Kelly, Evert Kroon, and Emmanuel E Baetge. 2005. “Efficient Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Definitive Endoderm.” *Nature Biotechnology* 23 (12): 1534–1541.
- D’Amour, Kevin A, Anne G Bang, Susan Eliazer, Olivia G Kelly, Alan D Agulnick, Nora G Smart, Mark A Moorman, Evert Kroon, Melissa K Carpenter, and Emmanuel E Baetge. 2006. “Production of Pancreatic Hormone–expressing Endocrine Cells from Human Embryonic Stem Cells.” *Nature Biotechnology* 24 (11): 1392–1401.
- DeFalco, Tony, Satoru Takahashi, and Blanche Capel. 2011. “Two Distinct Origins for Leydig Cell Progenitors in the Fetal Testis.” *Developmental Biology* 352 (1): 14–26.
- Diekman, Brian O, Christopher R Rowland, Donald P Lennon, Arnold I Caplan, and Farshid Guilak. 2010. “Chondrogenesis of Adult Stem Cells from Adipose Tissue and Bone Marrow: Induction by Growth Factors and Cartilage-Derived Matrix.” *Tissue Engineering. Part A* 16 (2): 523–533.
- Dominici, M, K Le Blanc, I Mueller, I Slaper-Cortenbach, Fc Marini, Ds Krause, Rj Deans, A Keating, Dj Prockop, and Em Horwitz. 2006. “Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement.” *Cytotherapy* 8 (4): 315–7.
- El Jamil, Anwar, Rasha Kanhoush, Solange Magre, Brigitte Boizet-Bonhoure, and May Penrad-Mobayed. 2008. “Sex-Specific Expression of SOX9 during Gonadogenesis in the Amphibian *Xenopus Tropicalis*.” *Developmental Dynamics* 237 (10): 2996–3005.
- Evans, Ben J., Darcy B. Kelley, Richard C. Tinsley, Don J. Melnick, and David C. Cannatella. 2004. “A Mitochondrial DNA Phylogeny of African Clawed Frogs: Phylogeography and Implications for Polyploid Evolution.” *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33 (1): 197–213.
- Evans, M J, and M H Kaufman. 1981. “Establishment in Culture of Pluripotential Cells from Mouse Embryos.” *Nature* 292: 154–6.
- Falconi, Dominic, and Jane E Aubin. 2007. “LIF Inhibits Osteoblast Differentiation at Least in Part by Regulation of HAS2 and Its Product Hyaluronan.” *Journal of Bone and Mineral Research : The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 22 (8): 1289–1300.
- Farokhpour, Mahboubah, Khadijeh Karbalaie, Somayeh Tanhaei, Marzeyeh Nematollahi, Mahmoud Etebari, Hamid Mirmohammad Sadeghi, Mohammad Hossein Nasr-Esfahani, and Hossein Baharvand. 2009. “Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes as a Model System to Study Cardioprotective Effects of Dexamethasone in Doxorubicin Cardiotoxicity.” *Toxicology in Vitro : An International Journal Published in Association with BIBRA* 23 (7): 1422–8.

- Friedenstein, Alexander J, J F Gorskaja, and N N Kulagina. 1976. "Fibroblast Precursors in Normal and Irradiated Mouse Hematopoietic Organs." *Experimental Hematology* 4 (5): 267–274.
- Gao, Yue, Shuyun Liu, Jingxiang Huang, Weimin Guo, Jifeng Chen, Li Zhang, Bin Zhao, Jiang Peng, Aiyuan Wang, YuWang, Wenjing Xu, Shibi Lu, Mei Yuan, and Quanyi Guo. 2014. "The ECM-Cell Interaction of Cartilage Extracellular Matrix on Chondrocytes." *BioMed Research International* 2014: 1–8.
- Ge, Ren-Shan, Qiang Dong, Chantal M Sottas, Vassilios Papadopoulos, Barry R Zirkin, and Matthew P Hardy. 2006. "In Search of Rat Stem Leydig Cells: Identification, Isolation, and Lineage-Specific Development." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (8) (February 21): 2719–24.
- Golestaneh, Nady, Maria Kokkinaki, Disha Pant, Jiji Jiang, David DeStefano, Carlos Fernandez-Bueno, Janice D Rone, Bassem R Haddad, G Ian Gallicano, and Martin Dym. 2009. "Pluripotent Stem Cells Derived from Adult Human Testes." *Stem Cells and Development* 18 (8) (October): 1115–26.
- Gonzalez, R., L. Griparic, V. Vargas, K. Burgee, P. SantaCruz, R. Anderson, M. Schiewe, F. Silva, and A. Patel. 2009. "A Putative Mesenchymal Stem Cells Population Isolated from Adult Human Testes." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 385 (4): 570–575.
- Guan, Kaomei, Karim Nayernia, Lars. S. Maier, Stefan Wagner, Ralf Dressel, Jae Ho Lee, Jessica Nolte, Frieder Wolf, Manyu Li, Wolfgang Engel and Gerd Hasenfuss. 2006. "Pluripotency of Spermatogonial Stem Cells from Adult Mouse Testis." *Nature* 440 (27): 1199–1203.
- Guan, Kaomei, Jürgen Rohwedel, and Anna M Wobus. 1999. "Embryonic Stem Cell Differentiation Models: Cardiogenesis, Myogenesis, Neurogenesis, Epithelial and Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation in Vitro." *Cytotechnology* 30 (1-3): 211–26.
- Gubbay, J, J Collignon, P Koopman, B Capel, a Economou, a Münsterberg, N Vivian, P Goodfellow, and R Lovell-Badge. 1990. "A Gene Mapping to the Sex-Determining Region of the Mouse Y Chromosome Is a Member of a Novel Family of Embryonically Expressed Genes." *Nature* 346 (6281): 245–250.
- Hadjidakis, Dimitrios J., and Ioannis I. Androulakis. 2006. "Bone Remodeling." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1092: 385–396.
- Hata, Ryu-Ichiro, and Haruki Senoo. 1989. "L-Ascorbic Acid 2-Phosphate Stimulates Collagen Accumulation, Cell Proliferation, and Formation of a Three-Dimensional Tissuelike Substance by Skin Fibroblasts." *Journal of Cellular Physiology* 138 (1) (January 1): 8–16.
- Hatori, Masanori, Nobuhiro Shimozawa, Lubna Yasmin, Hirofumi Suemori, Norio Nakatsuji, Atsuo Ogura, Ken Ichi Yagami, and Tadashi Sankai. 2014. "Role of Retinoic Acid and Fibroblast Growth Factor 2 in Neural Differentiation from Cynomolgus Monkey (Macaca Fascicularis) Embryonic Stem Cells." *Comparative*

- Medicine* 64 (2): 140–147.
- Heasman, Janet, J. Quarmby, and C. C. Wylie. 1984. “The Mitochondrial Cloud of *Xenopus* Oocytes: The Source of Germinal Granule Material.” *Developmental Biology* 105 (2): 458–469.
- Hellsten, U, Rm Harland, Mj Gilchrist, D Hendrix, J Jurka, Kapitonov V, I Ovcharenko, Nicholas H. Putnam, Shengqiang Shu, Leila Taher, Ira L. Blitz, Bruce Blumberg, Darwin S. Dichmann, Inna Dubchak, Enrique Amaya, John C. Detter, Russell Fletcher, Daniela S. Gerhard, David Goodstein, Tina Graves, Igor V. Grigoriev, Jane Grimwood, Takeshi Kawashima, Erika Lindquist, Susan M. Lucas, Paul E. Mead, Therese Mitros, Hajime Ogino, Yuko Ohta, Alexander V. Poliakov, Nicolas Pollet, Jacques Robert, Asaf Salamov, Amy K. Sater, Jeremy Schmutz, Astrid Terry, Peter D. Vize, Wesley C. Warren, Dan Wells, Andrea Wills, Richard K. Wilson, Lyle B. Zimmerman, AaronM. Zorn, Robert Grainger, TimothyGrammer, MustafaK.Khokha, Paul M. Richardson and Daniel S. Rokhsar. 2010. “The Genome of the Western Clawed Frog *Xenopus Tropicalis*.” *Science (New York, N.Y.)* 328 (April): 633–636.
- Hematti, Peiman. 2012. “Mesenchymal Stromal Cells and Fibroblasts: A Case of Mistaken Identity?” *Cytotherapy* 14 (5): 516–21.
- Holland, Peter W H, H Anne F Booth, and Elspeth A Bruford. 2007. “Classification and Nomenclature of All Human Homeobox Genes.” *BMC Biology* 5: 47.
- Hong, Dun, Hai Xiao Chen, Yun Xue, Dong Mei Li, Xiao Chen Wan, Renshan Ge, and Ji Cheng Li. 2009. “Osteoblastogenic Effects of Dexamethasone through Upregulation of TAZ Expression in Rat Mesenchymal Stem Cells.” *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 116 (1-2): 86–92.
- Höpfl, Gisele, Max Gassmann, and Isabelle Desbaillets. 2004. “Differentiating Embryonic Stem Cells into Embryoid Bodies.” In *Germ Cell Protocols: Volume 2: Molecular Embryo Analysis, Live Imaging, Transgenesis, and Cloning*, edited by Heide Schatten, 79–98.
- Chen, Haolin, Ren-Shan Ge, and Barry R Zirkin. 2009. “Leydig Cells: From Stem Cells to Aging.” *Molecular and Cellular Endocrinology* 306 (1-2) (July 10): 9–16.*
- Chen, Li-Bo, Xiao-Bing Jiang, and Lian Yang. 2004. “Differentiation of Rat Marrow Mesenchymal Stem Cells into Pancreatic Islet Beta-Cells.” *World Journal of Gastroenterology : WJG* 10 (20): 3016–3020.
- Chen, Ming-Yan, Pu-Chang Lie, Zhi-Ling Li, and Xing Wei. 2009. “Endothelial Differentiation of Wharton’s Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells in Comparison with Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells.” *Experimental Hematology* 37 (5): 629–640.
- Chen, Yucui, Beth Stevens, Jufang Chang, Jeffrey Milbrandt, Ben a Barres, and Johannes W Hell. 2009. “NS21: Re-Defined and Modified Supplement B27 for Neuronal Cultures.” *Journal of Neuroscience* 171 (2): 239–247.
- Chikhovskaya, J. V., M. J. Jonker, A. Meissner, T. M. Breit, S. Repping, and A. M M Van Pelt. 2012. “Human Testis-Derived Embryonic Stem Cell-like Cells Are Not

- Pluripotent, but Possess Potential of Mesenchymal Progenitors.” *Human Reproduction* 27 (1): 210–221.
- Chikhovskaya, J. V., S. K M van Daleen, C. M. Korver, S. Repping, and A. M M van Pelt. 2014. “Mesenchymal Origin of Multipotent Human Testis-Derived Stem Cells in Human Testicular Cell Cultures.” *Molecular Human Reproduction* 20 (2): 155–167.
- Chung, Chun-Hsi, Ellis E Golub, Elizabeth Forbes, Toshikazu Tokuoka, and Irving M Shapiro. 1992. “Mechanism of Action of β -Glycerophosphate on Bone Cell Mineralization.” *Calcified Tissue International* 51 (4): 305–311.
- Javanmardy, S., M. H. Asadi, M. Movahedin, F. Moradpour, and H. Bahadoran. 2016. “Derivation of Motor Neuron-like Cells from Neonatal Mouse Testis in a Simple Culture Condition.” *Andrologia*: 1–8.
- Jeanes, Angela, Dagmar Wilhelm, Megan J. Wilson, Josephine Bowles, Peter J. McClive, Andrew H. Sinclair, and Peter Koopman. 2005. “Evaluation of Candidate Markers for the Peritubular Myoid Cell Lineage in the Developing Mouse Testis.” *Reproduction* 130 (4): 509–516.
- Jenab, Shirzad, and Patricia L. Morris. 1998. “Testicular Leukemia Inhibitory Factor (LIF) and LIF Receptor Mediate Phosphorylation of Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT)- 3 and STAT-1 and Induce c-Fos Transcription and Activator Protein-1 Activation in Rat Sertoli but Not Germ cells.” *Endocrinology* 139 (4): 1883–1890.
- Johnstone, B, T M Hering, a I Caplan, V M Goldberg, and J U Yoo. 1998. “In Vitro Chondrogenesis of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Progenitor Cells.” *Experimental Cell Research* 238 (1): 265–272.
- Kanatsu, Mito, and Shin-Ichi Nishikawa. 1996. “In Vitro Analysis of Epiblast Tissue Potency for Hematopoietic Cell Differentiation.” *Development (Cambridge, England)* 122 (3) (March): 823–30.
- Kanatsu-Shinohara, Mito, Kimiko Inoue, Jiyoung Lee, Momoko Yoshimoto, Narumi Ogonuki, Hiromi Miki, Shiro Baba, Takeo Kato, Yasuhiro Kazuki, Shinya Toyokuni, Megumi Toyoshima, Ohtsura Niwa, Mitsuo Oshimura, Toshio Heike, Tatsutoshi Nakahata, Fumitoshi Ishino, Atsuo Ogura and Takashi Shinohara. 2004. “Generation of Pluripotent Stem Cells from Neonatal Mouse Testis.” *Cell* 119 (7) (December 29): 1001–12.
- Kanatsu-Shinohara, Mito, Jiyoung Lee, Kimiko Inoue, Narumi Ogonuki, Hiromi Miki, Shinya Toyokuni, Masahito Ikawa, Tomoyuki Nakamura, Atsuo Ogura, and Takashi Shinohara. 2008. “Pluripotency of a Single Spermatogonial Stem Cell in Mice.” *Biology of Reproduction* 78 (4) (April): 681–7.
- Kanatsu-Shinohara, Mito, Hiromi Miki, Kimiko Inoue, Narumi Ogonuki, Shinya Toyokuni, Atsuo Ogura, and Takashi Shinohara. 2005. “Long-Term Culture of Mouse Male Germline Stem Cells under Serum-or Feeder-Free Conditions.” *Biology of Reproduction* 72 (4) (April): 985–91.
- Kanatsu-Shinohara, Mito, Narumi Ogonuki, Kimiko Inoue, Hiromi Miki, Atsuo Ogura,

- Shinya Toyokuni, and Takashi Shinohara. 2003. "Long-Term Proliferation in Culture and Germline Transmission of Mouse Male Germline Stem Cells." *Biology of Reproduction* 69 (2) (August): 612–6.
- Karl, J, and B Capel. 1998. "Sertoli Cells of the Mouse Testis Originate from the Coelomic Epithelium." *Developmental Biology* 203 (2): 323–33.
- Kashiwagi, Keiko, Akihiko Kashiwagi, Atsushi Kurabayashi, Hideki Hanada, Keisuke Nakajima, Morihiro Okada, Minoru Takase, and Yoshio Yaoita. 2010. "Xenopus Tropicalis: An Ideal Experimental Animal in Amphibia." *Experimental Animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science* 59 (4): 395–405.
- Kaur, Gurvinder, Lea Ann Thompson, and J. M. Dufour. 2015. "Sertoli Cells-Immunological Sentinels of Spermatogenesis" 19 (2): 161–169.
- Kent, J, S C Wheatley, J E Andrews, a H Sinclair, and P Koopman. 1996. "A Male-Specific Role for SOX9 in Vertebrate Sex Determination." *Development (Cambridge, England)* 122 (9): 2813–2822.
- Khokha, Mustafa K., Christina Chung, Erika L. Bustamante, Lisa W K Gaw, Kristin A. Trott, Joanna Yeh, Nancy Lim, Jennifer C.Y. Lin, Nicola Taverner, Enrique Amaya, Nancy Papalopulu, James C. Smith, Aaron M. Zorn, Richard M. Harland and Timothy C. Grammer. 2002. "Techniques and Probes for the Study of Xenopus Tropicalis Development." *Developmental Dynamics* 225 (4): 499–510.
- Kloc, Malgorzata, Matthew T Dougherty, Szczepan Bilinski, Agnes P Chan, Eric Brey, Mary Lou King, Charles W Patrick, and Laurence D Etkin. 2002. "Three-Dimensional Ultrastructural Analysis of RNA Distribution within Germinal Granules of Xenopus." *Developmental Biology* 241: 79–93.
- Ko, Kinarm, Natalia Tapia, Guangming Wu, Jeong Beom Kim, Marcos J Araújo Bravo, Philipp Sasse, Tamara Glaser, David Ruau, Dong Wook Han, Boris Greber, Kirsten Hausdorfer, Vittorio Sebastiano, Martin Stehling, Bernd K. Fleischmann, Oliver Brustle, Martin Zenke and Hans R. Scholer. 2009. "Induction of Pluripotency in Adult Unipotent Germline Stem Cells." *Cell Stem Cell* 5 (1) (July 2): 87–96.
- Kobolak, Julianna, Andras Dinnyes, Adnan Memic, Ali Khademhosseini, and Ali Mobasher. 2015. "Mesenchymal Stem Cells: Identification, Phenotypic Characterization, Biological Properties and Potential for Regenerative Medicine through Biomaterial Micro-Engineering of Their Niche." *Methods* 99: 62–68.*
- Kolb, Hubert, and Volker Burkart. 1999. "Nicotinamide in Type 1 Diabetes. Mechanism of Action Revisited." *Diabetes Care* 22: B16–B20.
- Kossack, Nina, Juanito Meneses, Shai Shefi, Ha Nam Nguyen, Shawn Chavez, Cory Nicholas, Joerg Gromoll, Paul J Turek, and Renee A Reijo-Pera. 2009. "Isolation and Characterization of Pluripotent Human Spermatogonial Stem Cell-Derived Cells." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 27 (1) (January): 138–49.
- Kroon, E, L A Martinson, K Kadoya, A G Bang, O G Kelly, S Eliazar, H Young, Mike Richardson, Nora G Smart, Justine Cunningham, Alan D Agulnick, Kevin A D'Amour, Melissa K Carpenter and Emmanuel E Baetge. 2008. "Pancreatic Endoderm Derived from Human Embryonic Stem Cells Generates Glucose-

- Responsive Insulin-Secreting Cells in Vivo.” *Nat Biotechnol* 26 (4): 443–452.
- Kubo, Atsushi, Katsunori Shinozaki, John M Shannon, Valerie Kouskoff, Marion Kennedy, Savio Woo, Hans Joerg Fehling, and Gordon Keller. 2004. “Development of Definitive Endoderm from Embryonic Stem Cells in Culture.” *Development (Cambridge, England)* 131 (7): 1651–1662.
- Lee, Tae-Jin, Jiho Jang, Seokyoung Kang, Suk Ho Bhang, Gun-Jae Jeong, Heungsoo Shin, Dong-Wook Kim, and Byung-Soo Kim. 2014. “Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Medium Enhances Osteogenic and Chondrogenic Differentiation of Human Embryonic Stem Cells and Human Induced Pluripotent Stem Cells by Mesodermal Lineage Induction.” *Tissue Engineering: Part A* 20 (7-8): 1306–13.
- Lin, Yunfeng, En Luo, Xizhe Chen, Lei Liu, Ju Qiao, Zhengbin Yan, Zhiyong Li, Wei Tang, Xiaohui Zheng, and Weidong Tian. 2005. “Molecular and Cellular Characterization during Chondrogenic Differentiation of Adipose Tissue-Derived Stromal Cells in Vitro and Cartilage Formation in Vivo.” *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 9 (4): 929–939.
- Liu, Wenguang, Satoru Toyosawa, Tatsuya Furuichi, Naoko Kanatani, Carolina Yoshida, Yang Liu, Miki Himeno, Satoru Narai, Akira Yamaguchi, and Toshihisa Komori. 2001. “Overexpression of Cbfa1 in Osteoblasts Inhibits Osteoblast Maturation and Causes Osteopenia with Multiple Fractures.” *Journal of Cell Biology* 155 (1): 157–166.
- Longobardi, Lara, Lynda O’Rear, Srikanth Aakula, Brian Johnstone, Kimberly Shimer, Anna Chytil, William A Horton, Harold L Moses and Anna Spagnoli. 2005. “Effect of IGF-I in the Chondrogenesis of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in the Presence or Absence of TGF- β Signaling.” *Journal of Bone and Mineral Research* 21 (4): 626–636.
- Maekawa, Mamiko, Kyoko Kamimura, and Toshio Nagano. 1996. “Peritubular Myoid Cells in the Testis: Their Structure and Function.” *Archives of Histology and Cytology* 59 (1): 1–13.
- Mareschi, Katia, Monica Novara, Deborah Rustichelli, Ivana Ferrero, Daniela Guido, Emilio Carbone, Enzo Medico, Enrico Madon, Alessandro Vercelli, and Franca Fagioli. 2006. “Neural Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells: Evidence for Expression of Neural Markers and Eag K⁺ Channel Types.” *Experimental Hematology* 34 (11): 1563–1572.
- Martin, Gail R. 1981. “Isolation of a Pluripotent Cell Line from Early Mouse Embryos Cultured in Medium Conditioned by Teratocarcinoma Stem Cells.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (12) (December): 7634–8.
- Matsui, Yasuhisa, Krisztina Zsebo, and Brigid L M Hogan. 1992. “Derivation of Pluripotential Embryonic Stem Cells from Murine Primordial Germ Cells in Culture.” *Cell* 70 (5) (September): 841–847.
- McLean, Amanda B, Kevin a D’Amour, Karen L Jones, Malini Krishnamoorthy, Michael J Kulik, David M Reynolds, Alan M Sheppard, Huiqing Liu, Ying Xu, Emmanuel

- E. Baetge and Stephen Dalton. 2007. "Activin a Efficiently Specifies Definitive Endoderm from Human Embryonic Stem Cells Only When Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Is Suppressed." *Stem Cells* 25 (1): 29–38.
- Merchant-Larios, H., N. Moreno-Mendoza, and M. Buehr. 1993. "The Role of the Mesonephros in Cell Differentiation and Morphogenesis of the Mouse Fetal Testis." *International Journal of Developmental Biology* 37 (3): 407–415.
- Moghadasali, Reza, M Sc, Bahman Zeynali, Ph D, Masoud Soleimani, and Maryam Hatami. 2007. "Effect of Astrocyte-Conditioned Medium , Retinoic Acid and Basic Fibroblast Growth Factor on Neural Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells." *Yakhteh Medical Journal* 9 (3): 176–183.
- Moraveji, Seyedeh-Faezeh, Farnoosh Attari, Abdolhossein Shahverdi, Houri Sepehri, Ali Farrokhi, Seyedeh-Nafiseh Hassani, Hananeh Fonoudi, Nasser Aghdami, and Hossein Baharvand. 2012. "Inhibition of Glycogen Synthase Kinase-3 Promotes Efficient Derivation of Pluripotent Stem Cells from Neonatal Mouse Testis." *Human Reproduction (Oxford, England)* 27 (8): 2312–24.
- Moriya, Naomi, Shinji Komazaki, Shuji Takahashi, Chika Yokota, and Makoto Asashima. 2000. "In Vitro Pancreas Formation from Xenopus Ectoderm Treated with Activin and Retinoic Acid." *Development Growth and Differentiation* 42 (6): 593–602.
- Morrison, Gillian M, and Joshua M Brickman. 2006. "Conserved Roles for Oct4 Homologues in Maintaining Multipotency during Early Vertebrate Development." *Development (Cambridge, England)* 133 (10): 2011–2022.
- Na, Kun, Seong Jun Choi, Sungwon Kim, Bo Kyung Sun, Dae Gyun Woo, Hyung Min Chung, and Keun Hong Park. 2007. "Enhancement of Cell Proliferation and Differentiation by Combination of Ascorbate and Dexamethasone in Thermo-Reversible Hydrogel Constructs Embedded with Rabbit Chondrocytes." *Biotechnology Letters* 29 (10): 1453–1457.
- Nel-Themaat, L, Tegy J Vadakkan, Y Wang, Mary E Dickinson, H Akiyama, and Richard R Behringer. 2011. "Morphometric Analysis of Testis Cord Formation in Sox9-EGFP Mice" 4 (164): 1100–1110.
- Oatley, Jon M, and Ralph L Brinster. 2012. "The Germline Stem Cell Niche Unit in Mammalian Testes." *Physiological Reviews* 92 (2): 577–95. *
- Ogata, Y., M. Yamauchi, R. H. Kim, J. J. Li, L. P. Freedman, and J. Sodek. 1995. "Glucocorticoid Regulation of Bone Sialoprotein (BSP) Gene Expression - Identification of a Glucocorticoid Response Element in the Bone Sialoprotein Gene Promoter." *European Journal of Biochemistry* 230 (1): 183–192.
- Piquet-Pellorce, C, I Dorval-Coiffec, M D Pham, and B Jégou. 2000. "Leukemia Inhibitory Factor Expression and Regulation within the Testis." *Endocrinology* 141 (3): 1136–1141.
- Pytlík, Robert, David Stehlík, Tomáš Soukup, Marie Kalbáčová, František Rypáček, Tomáš Trč, Katarína Mulinková, Petra Michnová, Linda Kideryová, Jan Živný, Pavel Klener, Jr., Romana Veselá, Marek Trněný and Pavel Klener. 2009. "The

- Cultivation of Human Multipotent Mesenchymal Stromal Cells in Clinical Grade Medium for Bone Tissue Engineering.” *Biomaterials* 30 (20): 3415–3427.
- Rajala, Kristiina, Mari Pekkanen-Mattila, and Katriina Aalto-Setälä. 2011. “Cardiac Differentiation of Pluripotent Stem Cells.” *Stem Cells International* 2011 (1): 1–12.
- Rebourcet, Diane, Peter J. O’Shaughnessy, Ana Monteiro, Laura Milne, Lyndsey Cruickshanks, Nathan Jeffrey, Florian Guillou, Tom C. Freeman, Rod T. Mitchell, and Lee B. Smith. 2014. “Sertoli Cells Maintain Leydig Cell Number and Peritubular Myoid Cell Activity in the Adult Mouse Testis.” *PLoS ONE* 9 (8): 2139–2149.
- Resnick, James L, Lynn S Bixler, Linzhao Cheng, and Peter J Donovan. 1992. “Long-Term Proliferation of Mouse Primordial Germ Cells in Culture.” *Nature* 359 (6395) (October 8): 550–1.
- Rosen, Evan D., Pasha Sarraf, Amy E. Troy, Gary Bradwin, Kathryn Moore, David S. Milstone, Bruce M. Spiegelman, and Richard M. Mortensen. 1999. “PPAR γ Is Required for the Differentiation of Adipose Tissue in Vivo and in Vitro.” *Molecular Cell*.
- Santos, T. M., L. S. Percegon, P. González, A. Calil, C. Corradi Perini, F. R. Faucz, N. O S Câmara, and C. A M Aita. 2010. “Expression of Pancreatic Endocrine Markers by Mesenchymal Stem Cells From Human Umbilical Cord Vein.” *Transplantation Proceedings* 42 (2): 563–565.
- Sekido, Ryohei, Isabelle Bar, Véronica Narváez, Graeme Penny, and Robin Lovell-Badge. 2004. “SOX9 Is up-Regulated by the Transient Expression of SRY Specifically in Sertoli Cell Precursors.” *Developmental Biology* 274 (2): 271–279.
- Shi, Yan, Lingling Hou, Fuchou Tang, Wei Jiang, Peigang Wang, Mingxiao Ding, and Hongkui Deng. 2005. “Inducing Embryonic Stem Cells to Differentiate into Pancreatic Beta Cells by a Novel Three-Step Approach with Activin A and All-Trans Retinoic Acid.” *Stem Cells* 23 (5): 656–662.
- Shim, J. H., S. E. Kim, D. H. Woo, S. K. Kim, C. H. Oh, R. McKay, and J. H. Kim. 2007. “Directed Differentiation of Human Embryonic Stem Cells towards a Pancreatic Cell Fate.” *Diabetologia* 50 (6): 1228–1238.
- Silva, Jose, Jennifer Nichols, Thorold W. Theunissen, Ge Guo, Anouk L. van Oosten, Ornella Barrandon, Jason Wray, Shinya Yamanaka, Ian Chambers, and Austin Smith. 2009. “Nanog Is the Gateway to the Pluripotent Ground State.” *Cell* 138 (4): 722–737.
- Skinner, M K, P S Tung, and I B Fritz. 1985. “Cooperativity between Sertoli Cells and Testicular Peritubular Cells in the Production and Deposition Ofextracellular Matrix Components.” *J.Cell.Biol* 100 (4): 1941–1947.
- Song, In-Hwan, Arnold I Caplan, and James E Dennis. 2009. “In Vitro Dexamethasone Pretreatment Enhances Bone Formation of Human Mesenchymal Stem Cells in Vivo.” *Journal of Orthopaedic Research : Official Publication of the Orthopaedic Research Society* 27 (7): 916–21.

- Steger, K, R Rey, S Kliesch, F Louis, G Schleicher, and M Bergmann. 1996. "Immunohistochemical Detection of Immature Sertoli Cell Markers in Testicular Tissue of Infertile Adult Men: A Preliminary Study." *International Journal of Andrology* 19 (2): 122–128.
- Stevens, Leroy C. 1984. "Spontaneous and Experimentally Induced Testicular Teratomas in Mice." *Cell Differentiation* 15 (2-4) (December): 69–74.
- Stimpfel, Martin, Thomas Skutella, Mikael Kubista, Elvira Malicev, Sabine Conrad, and Irma Virant-Klun. 2012. "Potential Stemness of Frozen-Thawed Testicular Biopsies without Sperm in Infertile Men Included into the in Vitro Fertilization Programme." *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012: 1–15.
- Sun, T-J, R Tao, Y-Q Han, G Xu, J Liu, and Y-F Han. 2015. "Wnt3a Promotes Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells to Differentiate into Epidermal-like Cells." *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 19 (1): 86–91.
- Susumu Ikehara, Ming Li. 2013. "Immunomodulatory Properties and Therapeutic Application of Bone Marrow Derived-Mesenchymal Stem Cells." *Journal of Bone Marrow Research* 01 (04): 1–5.
- Takahashi, Tomosaburo, Bernadette Lord, P. Christian Schulze, Ryan M. Fryer, Satinder S. Sarang, Steven R. Gullans, and Richard T. Lee. 2003. "Ascorbic Acid Enhances Differentiation of Embryonic Stem Cells into Cardiac Myocytes." *Circulation* 107 (14): 1912–1916.
- Takamizawa, Shinji, Yojiro Maehata, Katsuyuki Imai, Haruki Senoo, Sadao Sato, and Ryu Ichiro Hata. 2004. "Effects of Ascorbic Acid and Ascorbic Acid 2-Phosphate, a Long-Acting Vitamin C Derivative, on the Proliferation and Differentiation of Human Osteoblast-like Cells." *Cell Biology International* 28 (4): 255–265.
- Teerds, K J, M de Boer-Brouwer, J H Dorrington, M Balvers, and R Ivell. 1999. "Identification of Markers for Precursor and Leydig Cell Differentiation in the Adult Rat Testis Following Ethane Dimethyl Sulphonate Administration." *Biology of Reproduction* 60 (6): 1437–45.
- Tenenbaum, Howard C, and Johan N M Heersche. 1985. "Dexamethasone Stimulates Osteogenesis in Chick Periosteum in Vitro." *Endocrinology* 117 (5) (November 1): 2211–2217.
- Thomson, James A, Joseph Itskovitz-Eldor, Sander S Shapiro, Michelle A Waknitz, Jennifer J Swiergiel, Vivienne S Marshall, and Jeffrey M Jones. 1998. "Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts." *Science* 282 (5391) (November 6): 1145–1147.
- Tlapakova, Tereza, Thi Minh Xuan Nguyen, Marketa Vegrichtova, Monika Sidova, Karolina Strnadova, Monika Blahova, and Vladimir Krylov. 2016. "Identification and Characterization of X. Tropicalis Common Progenitors of Sertoli and Peritubular Myoid Cell Lineages." *Biology Open*: 1–9.
- Vater, Corina, Philip Kasten, and Maik Stiehler. 2011. "Culture Media for the Differentiation of Mesenchymal Stromal Cells." *Acta Biomaterialia* 7 (2): 463–477.

- Walsh, S, G R Jordan, C Jefferiss, K Stewart, and J N Beresford. 2001. "High Concentrations of Dexamethasone Suppress the Proliferation but Not the Differentiation or Further Maturation of Human Osteoblast Precursors in Vitro: Relevance to Glucocorticoid-Induced Osteoporosis." *Rheumatology* 40 (1): 74–83.
- Wang, Xiang, and Phillip Yang. 2008. "In Vitro Differentiation of Mouse Embryonic Stem (mES) Cells Using the Hanging Drop Method." *Journal of Visualized Experiments : JoVE* (July): 2–3.
- Wislet-Gendebien, Sabine, Grégory Hans, Pierre Leprince, Jean-Michel Rigo, Gustave Moonen, and Bernard Rogister. 2005. "Plasticity of Cultured Mesenchymal Stem Cells: Switch from Nestin-Positive to Excitable Neuron-like Phenotype." *Stem Cells* 23 (3): 392–402.
- Woodbury, D, E J Schwarz, D J Prockop, and I B Black. 2000. "Adult Rat and Human Bone Marrow Stromal Cells Differentiate into Neurons." *Journal of Neuroscience Research* 61 (4): 364–370.
- Wu, Zhidan, Evan D. Rosen, Regina Brun, Stefanie Hauser, Guillaume Adelmant, Amy E. Troy, Catherine McKeon, Gretchen J. Darlington, and Bruce M. Spiegelman. 1999. "Cross-Regulation of C/EBP α and PPAR γ Controls the Transcriptional Pathway of Adipogenesis and Insulin Sensitivity." *Molecular Cell* 3 (2): 151–158.
- Wylie, C C, J Heasman, A Snape, M O'Driscoll, and Stephen Holwill. 1985. "Primordial Germ Cells of *Xenopus laevis* Are Not Irreversibly Determined Early in Development." *Developmental Biology* 112 (66): 66–72.
- Yagi, Mio, Motoo Takenaka, Katsushi Suzuki, and Hiroetsu Suzuki. 2007. "Reduced Mitotic Activity and Increased Apoptosis of Fetal Sertoli Cells in Rat Hypogonadic (Hgn/hgn) Testes." *Journal of Reproduction and Fertility* 53 (3): 581–589.
- Yasunaga, Masahiro, Shinsuke Tada, Satomi Torikai-Nishikawa, Yoko Nakano, Mitsuhiro Okada, Lars Martin Jakt, Satomi Nishikawa, Tsutomu Chiba, Takumi Era, and Shin-Ichi Nishikawa. 2005. "Induction and Monitoring of Definitive and Visceral Endoderm Differentiation of Mouse ES Cells." *Nature Biotechnology* 23 (12): 1542–1550.
- Ying, Qi-Long, Marios Stavridis, Dean Griffiths, Meng Li, and Austin Smith. 2003. "Conversion of Embryonic Stem Cells into Neuroectodermal Precursors in Adherent Monoculture." *Nature Biotechnology* 21 (2) (February): 183–6.
- Yoshida, Shosei, Mamiko Sukeno, and Yo-Ichi Nabeshima. 2007. "A Vasculature-Associated Niche for Undifferentiated Spermatogonia in the Mouse Testis." *Science (New York, N.Y.)* 317 (5845) (September 21): 1722–6.

*sekundární citace